

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Expresión de Defensinas en Yeyuno de crías de
Alpacas (*Vicugna pacos*) con Enteropatías**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Juan José Siuce Moreno

Lima – Perú

2012

A Catalina, mi madre, por todos los días de esfuerzo, trabajo, sacrificio, entrega, y dedicar su vida entera a sus hijos, y sobre todo, por el inmenso amor que me brinda cada día.

A Juan, mi padre, por ser el mejor libro del que he aprendido y enseñarme todo, desde patear un balón hasta tomar las mejores decisiones de mi vida.

A mis hermanos Carlos, Miguel y Joanna, por todo el apoyo, cariño, comprensión y ayudarme a salir de mis problemas, errores y travesuras.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Doc, Alberto Manchego, por brindarme la oportunidad de formar parte del grupo con el presente trabajo de tesis, por los consejos para mi desarrollo profesional y por su amistad.

A Hermelinda Rivera, Nieves Sandoval y Mercy Ramírez, por todo el apoyo, sugerencias, conocimientos y experiencia en la elaboración de la tesis, y ese toque maternal en el Laboratorio

A Kim y Juan, por el gran aporte en la ejecución del presente trabajo y ser buenos amigos.

A Carla, Raquel, Víctor, Giovanni, Goyo, Juan Carlos, César, Luis y Vicente, gracias muchachos por su colaboración, solidaridad, recomendaciones y por hacer amenos los días en el laboratorio y otros lares.

A la Casa Verde, por los 6 años de momentos de todo calibre. A la gentita de la maestría, Veterinaria FC, ex Aduni, y todas las personas que me acompañan, brindan su amistad y matizan mi vida de emociones.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la expresión de péptidos antimicrobianos (α y β defensinas) en el epitelio intestinal de crías de Alpaca con enteropatías, de cero a 45 días de edad, mediante la cuantificación de ARN mensajeros (ARNm) de las α (*defa 8*) y β (β *def alp*) defensinas, utilizándose oligoneuclótidos diseñados por Patil y col. (2004) y a partir de secuencias publicadas en el Banco de Genes (GenBank) para bovinos (Acceso: AF016539.1), respectivamente. Se tomaron porciones de yeyuno, de 2 cm de longitud, de crías de Alpaca con signos de diarrea (n=29); además, se realizó el análisis histopatológico del tejido utilizando la tinción Hematoxilina-Eosina para determinar la enteropatía. Se obtuvo el ARNm total de los raspados yeyunales, que sirvió de molde para la síntesis de cDNA mediante transcripción reversa (RT), seguido de un PCR en Tiempo Real, para la amplificación y detección de las defensinas. La cuantificación relativa de ARNm, se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Las crías enfermas mostraron una expresión de *Defa 8* correspondiente a 18.15 veces lo expresado por el animal recién nacido o calibrador. Similarmente, se observó que la expresión de β -*def alp* correspondiente a 258.29 veces lo expresado por el calibrador, encontrando diferencia significativa ($p < 0.05$), tanto en *Defa 8* y β -*def alp* mediante la prueba T de Student, al compararlos con un grupo de crías de Alpacas sanas criadas en similares condiciones de un estudio previo. Los resultados demuestran que las α y β -defensinas entéricas son inducidas de manera significativa durante cuadros entéricos en las alpacas.

Palabras claves: alpacas, péptidos antimicrobianos, defensinas, PCR, RT-PCR tiempo real, cuantificación relativa

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the expression of antimicrobial peptides (α and β Defensins) in the intestinal epithelium of newborn alpacas from zero to 45 days old suffering enteropathy signs. We quantified messenger RNA (mRNA) of α (DEFA 8) and β (β def alp) defensins, using primers designed by Patil *et al.* (2004) and from published sequences in the gene bank (GenBank) for cattle complete mRNA (Access: AF016539.1), respectively. This was done by taking portions of jejunum, 2 cm long, from young alpacas with diarrhea (n = 29) and performed histopathological analysis of this tissue using hematoxylin-eosin staining to corroborate enteropathy cases. Total mRNA was obtained from jejunal scrapings, which served as template for cDNA synthesis by reverse transcription (RT), followed by Real-Time PCR for amplification and detection of defensins. Relative quantitation of mRNA was performed using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Expression of Defa8 in young alpacas suffering enteropathy was of 18.15 fold times was expressed by newborn animals or calibrators. Similarly, we observed that expression of β -def alp was 258.29 times fold what is expressed by the same calibrators, finding statistical difference (p < 0.05) of both, Defa8 and β -Defa def alp, by means of Student's T test when compared to a group of young healthy young alpacas raised in similar conditions of a previous study. The results conclude that enteric α and β -defensins are induced significantly during enteric disease in alpacas.

Keywords: alpacas, antimicrobial peptides, defensins, PCR, real-time RT-PCR, relative quantification

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Electroforesis de productos amplificados con el set de oligonucleótidos GAPDH.	29
Figura 2. Curva de disociación (T _m) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos GAPDH a partir de mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas	29
Figura 3. Curva de amplificación (Ct) de <i>Defa 8</i> (α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas	30
Figura 4. Temperatura de disociación de los productos amplificados de <i>Defa 8</i> (α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas.	31
Figura 5. Niveles de expresión de <i>Defa 8</i> (α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas	32
Figura 6. Niveles de expresión de <i>Defa 8</i> (α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas por semanas de edad	33
Figura 7. Niveles de expresión de <i>Defa 8</i> (α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas por semanas de edad.	34
Figura 8. Curva de amplificación (Ct) de los productos amplificados con el set de primers β - <i>def alp</i>	35
Figura 9. Temperatura de disociación de los productos amplificados con el set de primers β - <i>def alp</i>	35
Figura 10. Niveles de expresión de β - <i>def alp</i> en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas.	36
Figura 11. Niveles de expresión de β - <i>def alp</i> en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas por semanas de edad.	37
Figura 12. Niveles de expresión de β - <i>def alp</i> en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas por semanas de edad	38
Figura 13. Frecuencia de lesiones histopatológicas en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas con enteropatía	39
Figura 14. Cortes histológicos de yeyuno	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro A.1.	Resultados de la cuantificación relativa de α - defensina (<i>Defa 8</i>) de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador.	Pág. 56
Cuadro A.2.	Resultados de la cuantificación relativa de β - defensinas (β - <i>def alp</i>) de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador	57
Cuadro A.3.	Resultados de RT-PCR tiempo real de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas enfermas utilizando los cebadores GAPDH	58
Cuadro A.4.	Resultados de RT-PCR tiempo real de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas enfermas utilizando los cebadores <i>Defa 8</i> (α - defensina)	59
Cuadro A.5.	Resultados de RT-PCR tiempo real de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas utilizando los cebadores β - <i>def alp</i> (β - defensina).	60
Cuadro A.6.	Resultados de la cuantificación relativa de α - defensina (<i>Defa 8</i>) de mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas (enteropatías) con respecto al calibrador	61
Cuadro A.7.	Resultados de la cuantificación relativa de β - defensinas (β - <i>def alp</i>) de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas enfermas con respecto al calibrador	62

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE CUADROS	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Sanidad en crías de alpacas	2
2.1.1. Enterotoxemia	3
2.1.2. Diarrea Neonatal	4
2.2. Inmunidad de mucosas	5
2.2.1. Inmunidad innata de mucosas	5
2.2.1.1. Barrera celular	6
2.2.1.2. Respuesta inmune innata	8
2.3. Péptidos Antimicrobianos	9
2.3.1. Definición	9
2.3.2. Estructura	10
2.3.3. Clasificación	10
2.3.4. Distribución	11
2.3.5. Mecanismo de acción	12
2.3.5.1. Actividad a nivel de la membrana celular	12
2.3.5.2. Actividad a nivel intracelular	14
2.4. Defensinas	14
2.4.1. α - defensinas	15

2.4.1.1.	Distribución de las α -defensinas	16
2.4.1.2.	Estructura génica de las α -defensinas	16
2.4.1.3.	Síntesis de α -defensinas	17
2.4.1.4.	Regulación de la síntesis y expresión de las α -defensinas	17
2.4.2.	β - defensinas	18
2.4.2.1.	Distribución de las β - defensinas	18
2.4.2.2.	Estructura génica de las β - defensinas	19
2.4.2.3.	Síntesis de β - defensinas	19
2.4.2.4.	Regulación de la síntesis y expresión de las β - defensinas	19
2.4.3.	Defensinas en Camélidos Sudamericanos	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1.	Animales	21
3.2.	Obtención y almacenamiento de muestras	21
3.3.	Procesamiento de muestras	22
3.3.1.	Procesamiento de muestras para histopatología	22
3.3.2.	Procesamiento de muestras para la expresión molecular	22
3.4.	Expresión de α - y β - defensinas	22
3.4.1.	Extracción de ARN total	22
3.4.2.	Síntesis de cDNA (Transcripción reversa)	24
3.4.3.	PCR Tiempo Real Cuantitativo	24
3.4.4.	Cuantificación relativa α - y β - defensinas	26
3.5.	Análisis estadístico	27
IV.	RESULTADOS	28
4.1.	GAPDH	28
4.1.1.	Expresión de GAPDH	28
4.2.	<i>Defa 8</i> (α -defensina)	30
4.2.1.	Expresión de <i>Defa 8</i> (α -defensina)	30
4.2.2.	Cuantificación relativa de <i>Defa 8</i> (α -defensina)	31
4.3.	<i>β-def alp</i> (β -defensina)	34

4.3.1.	Expresión de β -def alp (β -defensina)	34
4.3.2.	Cuantificación relativa de β -def alp (β -defensina)	36
4.4.	Estudio histopatológico	38
V.	DISCUSIÓN	41
VI.	CONCLUSIÓN	46
VII.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	47
VIII.	APÉNDICE	55

I. INTRODUCCION

Los seres vivos están expuestos a una gran variedad de organismos patógenos a través de la vía digestiva. La inmunidad innata juega un papel importante en la defensa frente a estos microorganismos, siendo el intestino un importante órgano del sistema inmune de mucosas conformado por una compleja red celular (Yuan y Walker, 2004), con capacidad de reconocer antígenos para desarrollar una respuesta celular reguladora o efectora a través de sus secreciones como son las citoquinas, enzimas y péptidos antimicrobianos (Bailey y Haverson, 2006). Las defensinas son una gran familia de péptidos antimicrobianos, cuya expresión está extendida en todos los mamíferos (Ganz, 2003), son polipéptidos de 29 a 50 aminoácidos conformados principalmente por arginina y lisina, éstos péptidos catiónicos poseen una acción antimicrobial que incluyen bacterias, hongos, parásitos y virus (Sahl *et al.*, 2005). Las alpacas, en especial las crías, son susceptibles a sufrir procesos entéricos de diversos agentes infecciosos que ingresan a nivel de la mucosa intestinal, induciendo una respuesta inmune a este nivel. Se ha determinado la presencia de los genes de las α - y β -defensinas (*Defa 8* y *β -def alp*, respectivamente) en muestras de mucosa intestinal y sangre de alpacas; y se ha establecido su expresión (More *et al.*, 2011). Sin embargo aún se desconoce la respuesta de expresión de estas defensinas frente a las diferentes enteropatías que sufren las crías de alpacas en las primeras semanas de vida, cuyo resultado dará mayor conocimiento de la inmunidad innata en alpacas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sanidad en crías de alpacas

La producción de camélidos sudamericanos tiene graves pérdidas económicas, debido a diversas enfermedades infecciosas causantes de alta mortalidad y morbilidad en las crías y adultos, además, las enfermedades parasitarias afectan el estado general de los animales, disminuyendo la productividad al afectar la calidad de la carne y fibra (Fernández-Baca, 2005).

Las alpacas y llamas, especies domésticas de los Camélidos Sudamericanos, presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad en los primeros meses de vida, incluyendo este período la mortalidad perinatal (0-7 días de edad), la mortalidad neonatal (hasta los 30 días de edad) y mortalidad de crías mayores de un mes hasta el destete (hasta los 6 a 8 meses de edad) (Ameghino y De Martini, 1991). Se determinó que las muertes ocurren durante la etapa neonatal, siendo críticos los primeros 30 días de edad. Cuyos 4 primeros días, la mortalidad está originada por las inclemencias ambientales y/o manejo inadecuado, mientras que, desde los 5 hasta 30 días de edad las muertes son principalmente de origen infeccioso (Fernandez-Baca, 1991; Rosadio, 2010). Así, las enfermedades infecciosas son la principal causa de mortalidad en las crías, su presentación está asociada también a fallos en la transferencia de inmunidad pasiva de la madre a las crías a través del calostro, cuyo éxito en la transferencia

permite adecuadas concentraciones de inmunoglobulinas, lo que se asocia con altas posibilidades de supervivencia (Garmendia *et al.*, 1987). La deficiencia en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas en camélidos se debe a la placentación epiteliocorial difusa que poseen. (Ameghino y De Martini, 1991).

Entre las enfermedades infecciosas más frecuentes que causan mayor mortalidad en las crías de Alpaca se incluyen a la enterotoxemia, la diarrea neonatal, los procesos respiratorios agudos y las septicemias, la prevención y control de estas enfermedades es clave para la mejora de la producción y conservación de estos animales (Martín *et al.*, 2010).

2.1.1. Enterotoxemia

La enfermedad está producida por las toxinas de *Clostridium perfringens*, un bacilo grampositivo anaeróbico, forma esporas como mecanismo de resistencia, es ubicua en el medio ambiente y forma parte de la microbiota intestinal normal de los animales y del hombre (Martín *et al.*, 2010). Las toxinas en el lumen intestinal alteran la permeabilidad de la pared intestinal, resultando en acumulación de fluidos y electrolitos dentro del lumen, así como la absorción de toxinas al torrente sanguíneo (Ramírez *et al.*, 1998).

Se presenta con muerte súbita, el cual suele ser el único signo clínico. En otros casos, las crías afectadas muestran depresión, anorexia, postración con ojos cerrados, orejas dirigidas hacia atrás, y miembros estirados. Al progresar el cuadro se observa el abdomen distendido, las crías apoyan la cabeza en el suelo, emiten quejidos y presentan disnea. El cuadro toxémico, en su fase final, causa alteraciones nerviosas como convulsiones y opistótomos que conllevan a la muerte. La diarrea no se observa en la mayoría de los casos (Ramírez *et al.*, 1998; Pérez, 2006).

Entre las lesiones se incluyen intestinos congestionados, hemorrágicos y frecuentemente se observa inflamación de las placas de Peyer. Los ganglios mesentéricos suelen estar aumentados de tamaño, congestionados o hemorrágicos. La

mucosa del estómago glandular puede estar congestionada o hemorrágica. El hígado se observa congestionado y muchas veces amarillento, signo de degeneración grasa. Los pulmones pueden estar congestionados y edematosos. Todas estas alteraciones son compatibles con un cuadro septicémico (Ameghino y De Martini, 1991; Ramirez et al., 1998).

Histopatológicamente, la lesión más común encontrada en el intestino delgado, tanto en duodeno, yeyuno e íleon, es la enteritis necrótica (Palacios *et al.*, 2005).

2.1.2. Diarrea neonatal

Las diarreas neonatales están causadas por agentes infecciosos enteropatógenos que incluyen bacterias, virus y parásitos. Así están presentes agentes como rotavirus, coronavirus, determinadas estirpes de *Escherichia coli*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.* y coccidias (Martín *et al.*, 2010)

Se caracteriza por la aparición de diarrea, ausencia de fiebre, progresiva deshidratación y acidosis, postración y pérdida de peso hasta caquexia y la muerte de los animales, aunque algunas crías se recuperan. Sin embargo, las crías que logran recuperarse suelen presentar un retraso importante en el desarrollo con aspecto más débil y con mayor riesgo de desarrollar otras patologías (Fernández-Baca, 2005).

Los factores de riesgo implicados en la aparición de las diarreas neonatales son una elevada contaminación del aprisco por los enteropatógenos que son eliminados en las heces de forma continua o intermitente, además del deficiente estado nutricional e inmunitario de las madres y un incorrecto manejo de la toma del calostro. (Rosadio y Ameghino, 1994; Cebra *et al.*, 2003).

Los animales que mueren a causa de la diarrea generalmente presentan lesiones que varían en severidad y tipo de inflamación, los intestinos se encuentran dilatados por la acumulación de fluido y sin presencia de gas (Palacios *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2010)

2.2. Inmunidad de mucosas

Las mucosas son áreas en el cual ocurre el intercambio de compuestos químicos con el medio externo, por ejemplo, gases en los pulmones y nutrientes en intestino (Hathaway y Kraehenbuhl, 1999). Las superficies mucosas de las vías aéreas y el intestino poseen un área mayor al de la piel, con una magnitud aproximada de 400 m², por lo tanto, está expuesto continuamente a un gran carga antigénica asociada a microorganismos patógenos (Aguilera *et al.*, 2004). Frente a ello, las mucosas tienen un complejo sistema inmune anatómico-funcional denominado tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) capaz de producir rigurosas respuestas frente a patógenos, además de reconocer antígenos inocuos. Los MALT están distribuidos extensamente en diferentes regiones estratégicas, a través de las superficies de mucosas, que en el intestino se denomina tejido linfoide asociado a intestino (GALT) (Zarzaaur y Kudsk, 2001; Cesta, 2006; Liebler y Pabst, 2006;).

El GALT, anatómicamente está dividido en dos compartimentos: GALT organizado, cuya función es la inducción de la respuesta inmune, conformado por los agregados linfoides denominados Placas de Peyer, y los nódulos linfáticos mesentéricos; mientras que el GALT difuso, efector de la respuesta inmunitaria, está integrado por linfocitos intraepiteliales y células de la lámina propia (Bailey y Haverson, 2006; Wershil y Furuta, 2008).

Sin embargo, las células inmunes no están solas en la tarea de prevención de infecciones por los agentes patógenos. Es importante incluir en este sistema de defensa otros mecanismos considerados parte de la inmunidad innata, la barrera celular epitelial y defensas extraepiteliales, que en una acción combinada son capaces de realizar una respuesta inmunitaria eficiente enlazando la respuesta inmune innata a la adaptativa (Aguilera *et al.*, 2004; Fasano y Shea-Donohue, 2005).

2.2.1. Inmunidad innata de mucosas

Los seres vivos están protegidos por los dos elementos esenciales del sistema inmune, tanto la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Una respuesta específica,

tanto celular y humoral, desarrollada por la inmunidad adaptativa mediada a través de linfocitos T y B que ejercen una respuesta relativamente eficiente contra los diferentes agentes patógenos. Sin embargo, se necesita de un ordenamiento genético para generar una memoria inmunológica, que toma días a semanas para lograr una adecuada respuesta (Walker, 2002; Mesteckya *et al.*, 2004).

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa que provee protección al ser vivo, posee la capacidad de producir una respuesta relativamente no específica pero inmediata contra los diferentes microorganismos, al cual se encuentra expuesta la mucosa intestinal. Si bien, no genera una memoria inmunológica, sirve de puente para una respuesta adaptativa, a través de la producción de señales químicas como citoquinas (Yuan y Walker, 2004)

La defensa innata en intestino está mediada por componentes celulares, como las células epiteliales, dendríticas, polimorfonucleares y sus productos físico-químicos, que incluyen los movimientos peristálticos, secreción de mucus, sales biliares, enzimas digestivas, péptidos antimicrobianos y proteínas secretadas. Además, la función protectora del sistema inmune innato es favorecida por la flora comensal intestinal, que impide el ingreso o contacto con el epitelio de agentes patógenos, además de competir por nutrientes (Harrison y Maloy, 2011; Yount y Yeaman, 2004).

2.2.1.1. Barrera celular

Las células epiteliales del intestino forman una barrera con permeabilidad selectiva, estas células columnares forman una monocapa celular, que a través de sus uniones estrechas adherentes que evitan el ingreso de agentes patógenos (Iizuka y Konno, 2011). Estas células, son renovadas continuamente, provienen de la diferenciación de células madres pluripotentes que se encuentran ubicadas cerca a la base de las criptas de Lieberkühn, entre ellas tenemos a los enterocitos, células “goblet”, células enteroendocrinas y células de Paneth (Aguilera *et al.*, 2004; Kim y Ho, 2010).

Los enterocitos, son los más abundantes de los tipos celulares del epitelio intestinal, cuya función es la digestión y absorción de nutrientes, facilitado por la presencia de

microvellosidades en su superficie apical, que incrementa su superficie de absorción (Day, 2006; Wehkamp *et al.*, 2006). Éstas son renovadas constantemente cada 2-5 días, debido a la normal digestión, al ser dañadas por sustancias tóxicas, al interactuar con agentes microbianos, ante una inflamación, produciéndose su exfoliación y/o apoptosis (Iizuka y Konno, 2011).

Las células “goblet”, también denominadas caliciformes, localizadas en el epitelio de las vellosidades como en el de las criptas, morfológicamente poseen una región en el polo apical denominada “teca”, en el cual almacena los gránulos de mucina, teniendo así la función de formar la capa de mucus que brinda lubricación y protección a la mucosa intestinal. Además, produce Factor Trefoil, familia formada por péptidos pequeños (6.5-12 kDA), que son altamente expresados en el tracto gastrointestinal, que poseen un rol importante en la restitución celular (Kim y Ho, 2010).

Las células neuroendocrinas están ubicadas de manera dispersa y se encuentran en menor proporción al resto de tipos celulares del epitelio intestinal (Day, 2006). Sus secreciones están compuestas por diferentes hormonas, péptidos, enzimas que regulan la fisiología digestiva y con capacidad de alterar la composición de antígenos de diferentes agentes patógenos. Así tenemos la secreción gástrica, secreción pancreática y la contracción de la vesícula biliar, motilidad intestinal que ayuda la expulsión mecánica de agentes patógenos. Además, están implicadas en la detección y neutralización de patógenos al liberar quimiocinas y defensinas (Palazzo *et al.*, 2007).

Las células de Paneth, ubicados en la base de las criptas de Lieberkühn del intestino, adyacentes a las células madres pluripotenciales, son células de mayor tamaño en relación a las demás, poseen una forma piramidal, con un núcleo localizado en su base y grandes gránulos localizados apicalmente (Keshav, 2006). A diferencia de los demás tipos celulares en intestino, las células de Paneth, poseen un mayor tiempo de vida, aproximadamente 20 días (Cunliffe y Mahida, 2004). Los gránulos de las células de Paneth poseen lisozima y otros antimicrobianos que incluyen a la fosfolipasa A2 secretoria, angiogeninas, péptidos antimicrobianos como son las defensinas. Por lo tanto, este tipo celular, posee un rol importante en la defensa innata de mucosas en el intestino (Hooper *et al.*, 200; Bevins, 2005).

Entre estas células de la mucosa, tenemos a las denominadas “células M”, identificadas inicialmente por no poseer la característica de borde en cepillo de las microvellosidades en las células intestinales. Sin embargo, por su capacidad endocítica, son células especializadas en la captura y entrega de antígenos a linfocitos, que están ubicados en una estructura tipo bolsillo en su superficie basolateral, así estimula e induce una respuesta inmune (Hathaway y Kraehenbuhl, 1999).

Las células dendríticas están ubicadas estratégicamente debajo de las “células M”, que le permite obtener los antígenos, y así, realizar su función especializada de procesamiento y presentación de antígenos hacia los linfocitos T (Uhlir y Powrie, 2003; Haverson y Riffault, 2006), éstas células son abundantes en la mucosa intestinal, ubicados en tejidos linfoides organizados de placas de Peyer y lámina propia, activando así la respuesta inmunológica (Kelsall y Rescigno, 2004; Rutella y Locatelli, 2011). Las células dendríticas tiene la capacidad de transportar patógenos hacia los nódulos mesentéricos y el bazo, para la inducción de una respuesta inmune, de esta forma, éstas células están implicadas en la inducción de producción IgA (Aguilera *et al.*, 2004; Snoeck *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2009). Las células dendríticas, además de inducir la diferenciación de linfocitos, controlan el perfil de migración que adquieren los linfocitos tras la presentación antigénica teniendo así un papel central en los fenómenos de la homeostasis intestinal y por lo tanto de la tolerancia oral (Mowat *et al.*, 2004; Colonna *et al.*, 2006).

2.2.1.2.Respuesta inmune innata

Para iniciar una respuesta inmune, es necesaria la comunicación celular, para ello, las células del epitelio intestinal están provistas de moléculas sensoras o receptores presentes en el epitelio. Siendo capaces de reconocer estructuras propias de los patógenos, como son los lipopolisacaridos (LPS) de la pared celular, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, flagelina y ADN bacteriano. Estas estructuras preservadas de los diferentes microorganismos, son denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Hornef *et al.*, 2002; Marshall y Arenas, 2003; Mogensen, 2009).

Los sensores o receptores celulares, denominados receptores del patrón de reconocimiento (PRR), son las que activan vías de transducción celular e inician mecanismos de defensa innatos. Existen 2 grupos principales de PRRs, los receptores tipo Toll (TLRs) y las proteínas NOD (Yuan y Walker, 2004; Sanderson y Walker, 2007).

Los receptores tipo Toll (TLRs), son glicoproteínas integrales de membrana, éstos receptores al unirse con PAMPs inducen la producción de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, prostaglandinas, sustancias intermedias reactivas de oxígeno y nitrógeno, además de la expresión de péptidos antimicrobianos como las defensinas (Ganz, 2003; Sansonetti, 2006; Gribar *et al.*, 2008).

Los receptores NOD, a diferencia de los receptores tipo Toll (TLRs), se encuentran localizadas en el citoplasma, siendo de esta manera, un sistema de vigilancia intracelular o citoplasmático en la inmunidad innata, es expresado principalmente por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, así también, en células de Paneth y enterocitos. Induce la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria e inmune, al activar factores transcripcionales de la vía factor nuclear factor-kappaB (NF- κ B) (Yuan y Walker, 2004; Sanderson y Walker, 2007).

2.3. Péptidos antimicrobianos

2.3.1. Definición

Los péptidos antimicrobianos (AMPs), son un grupo de familias de moléculas antimicrobianas conformados por pequeñas proteínas o péptidos, con actividad contra diferentes microorganismos, en la que se incluyen a los virus, hongos, parásitos, y principalmente a las bacterias (Jensen *et al.*, 2006; Wiesner y Vilcinskas, 2010).

Los AMPs son componentes evolutivamente conservados de la respuesta inmune innata, son el principal sistema de defensa de la mayoría de organismos vivos, aislándose e identificándose cientos de ellos, además, son expresados en los diferentes

organismos eucariotas, tanto en las moscas, plantas, anfibios, aves, peces y mamíferos, incluyendo al humano (Uehara *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2006; Giuliani *et al.*, 2007). Efectores claves del sistema inmune, con capacidad de facilitar la fagocitosis, estimular la liberación de prostaglandinas, neutralizar la endotoxina de los lipopolisacáridos (LPS), reparación de heridas o cicatrización, promover el reclutamiento y acumulación de tipos celulares inmunes en lugares de inflamación. Algunos péptidos han demostrado tener un rol activo, en la transición de la respuesta inmune innata hacia la respuesta inmune adaptativa o adquirida, a través de la atracción quimiotáctica de monocitos y células T (Oppenheim *et al.*, 2003, Jensen *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007; Laverty *et al.*, 2011;).

2.3.2. Estructura

Los péptidos antimicrobianos son relativamente cortos, conformados de 12 a 100 residuos de aminoácidos, principalmente por aminoácidos con residuos positivos como son la arginina y lisina, que le confiere una carácter catiónico, generalmente con una carga neta de +2 a +9, con una disposición lineal o extendida, o adoptar la estructura secundaria de hoja- β , α -hélice y bucle. Los péptidos antimicrobianos, generalmente, adoptan una estructura anfipática, con extremos hidrofóbicos, que les permiten interaccionar con estructuras hidrofílicas como las membranas (Brogden K., 2005; Giuliani *et al.*, 2007).

2.3.3. Clasificación

A pesar que los péptidos antimicrobianos poseen una gran diversidad de origen y modificaciones evolutivas en las diferentes especies que las producen, se ha establecido una clasificación en cinco grupos de acuerdo a su composición de aminoácidos y su conformación estructural, el cual está relacionado con su función.

Los péptidos antimicrobianos α -hélice, no poseen cisteína, en sistemas acuosos son lineales y adoptan la conformación de α -hélice en solventes orgánicos, las cecropinas y

maganinas son los péptidos más conocidos de este grupo. El segundo grupo, conformado por péptidos ricos en cisteína que forman uniones tipo puente disulfuro, en el cual se encuentran las defensinas. El tercer grupo, péptidos de hoja- β , caracterizados por poseer 20 residuos y uno o dos enlaces disulfuro, que estabilizan su estructura de hoja- β antiparalelas. Otro grupo, conformado por péptidos que poseen una concentración relativa de un mismo aminoácido, el cual puede ser triptófano, prolina y las catelicidinas. El último grupo, es el conformado por péptidos producidos por bacterias y hongo, los cuales poseen aminoácidos modificados (Reddy *et al.*, 2004; Montaña y Vargas, 2002).

2.3.4. Distribución

Se han descrito y aislado más de 1700 péptidos antimicrobianos provenientes de diversos organismos, además de muchos péptidos análogos producidos sintéticamente (Lavery *et al.*, 2011).

Los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias, bacteriocinas, fueron los primeros en ser aislados y caracterizados. En plantas, péptidos con una estructura globular de hoja- β , denominados tioninas y defensinas, cumplen un gran rol inmune contra bacterias y hongos, demostrándose su potencial espectro de actividad *in vitro* (Tanabe *et al.*, 2004; Jenssen *et al.*, 2006).

Los invertebrados no poseen el sistema inmune adaptativo, considerándose un grupo de organismos con un efectivo mecanismo sistema inmune innato, que ha promovido el estudio intenso en especies como la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Los péptidos antimicrobianos, producidos por los invertebrados, son encontrados en la hemolinfa (plasma y hemocitos), en células fagocíticas y en algunas células epiteliales (Reddy *et al.*, 2004; Jenssen *et al.*, 2006).

En vertebrados, los péptidos antimicrobianos se encuentran en lugares de mayor contacto con los microorganismos, como superficies de mucosas y la piel. Catelicidinas, son un amplio grupo diverso de péptidos antimicrobianos, se encuentran dentro de los gránulos secretorios de células inmunes, principalmente en los

neutrófilos, además, pueden ser expresados en monocitos y células T, superficies de mucosas del tracto respiratorio, tracto genitourinario y piel (Giuliani *et al.*, 2007). Las defensinas, representan otro grupo importante de péptidos antimicrobianos en mamíferos, encontrándose en los gránulos de neutrófilos, macrófagos, células NK, células de Paneth, células epiteliales, en la piel, tracto respiratorio, tracto urogenital y muchos fluidos corporales (Reddy *et al.*, 2004; Jenssen *et al.*, 2006).

2.3.5. Mecanismo de acción

La principal función reconocida y estudiada de los péptidos antimicrobianos, es su actividad antimicrobial, ya sea contra bacterias, virus, hongos y parásitos (Ganz, 2003; Kamysz *et al.*, 2003; Jenssen *et al.*, 2006).

De acuerdo a sus determinantes estructurales como son: carga, conformación, ángulo polar, anfipaticidad e hidrofobicidad; los cuales están directamente relacionadas con la forma de interacción y acción con los diferentes microorganismos (Yeaman y Yount, 2003), se ha podido establecer dos principales formas de ejercer su función: realizándose diferentes experimentos que se han enfocado sobre la interacción de péptidos catiónicos con sistemas de modelos de membranas, cuyo efecto es la alteración de la permeabilidad; y péptidos con actividad intracelular, interrumpiendo principales procesos metabólicos (Giuliani *et al.*, 2007; Laverty *et al.*, 2011).

2.3.5.1. Actividad a nivel de la membrana celular

Las bacterias, han sido el principal blanco de los péptidos antimicrobianos, su membrana está compuesta por fosfolípidos como fosfatidilglicerol, cardiolipina o fosfatidilserina que le confieren una carga negativa, de esta forma los péptidos antimicrobianos con carga positiva son atraídos y ocurre la interacción electrostática. Por el contrario, las membranas de mamíferos, poseen una carga neutra, por estar conformadas por fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, o esfingomielinea, además la presencia de colesterol en la membrana le confiere estabilidad, reduciendo aún más la actividad de los péptidos antimicrobianos a células

propias (Zasloff, 2002; Reddy *et al.*, 2004; Rivas-Santiago *et al.*, 2006; Giulliani *et al.*, 2007).

La interacción inicial ocurre debido a la atracción de péptidos catiónicos y la carga negativa de los componentes presentes en la superficie bacteriana, como son los grupos fosfato en Gram negativas o ácidos lipoteicoicos en Gram positivas. De esta forma, los péptidos antimicrobianos alcanzan la membrana citoplasmática, donde entran a la región de interface de la membrana (entre sus porciones hidrofílicas e hidrofóbicas) en un proceso llevado a cabo por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Ganz, 2003; Jenssen *et al.*, 2006).

Para el siguiente paso, se han propuesto cuatro principales hipótesis: “poro tiroidal”, “el modelo de agregado”, “barrel stave” y el “modelo carpet”. En el cual, se produce un incremento en el radio péptido/lípido, lo que ocasiona una orientación de los péptidos, ya sea, perpendicular, paralela o sin orientación a la membrana, de acuerdo al modelo de hipótesis, cuyo propósito final, es la formación poros transmembrana y en última instancia, permeabilización de la membrana (Yeaman y Yount, 2003; Jenssen *et al.*, 2006; Laverty *et al.*, 2011).

Un similar patrón de disrupción de la membrana, ha sido demostrado por péptidos antimicrobianos contra un amplio grupo de patógenos fúngicos. La α -defensina NP-2 de conejo, magainin-2 y lactoferrin bovino producen la permeabilización de la membrana y daño en la pared celular en *Candida albicans* (Jenssen *et al.*, 2006; Laverty *et al.*, 2011).

La mangainina 2, fue uno de los primeros péptidos antimicrobianos descritos que muestran actividad antiparasitaria, específicamente contra protozoarios como *Paramecium caudatum*. De la misma forma, se ha demostrado el efecto antinematodal de la catelicidina porcina, contra huevos y parásitos de *Caenorhabditis elegans*, los estudios han indicado que el efecto es producido a través de la ruptura o daño en la membrana celular (Castañeda *et al.*, 2009).

Algunos péptidos tienen la capacidad de interactuar con la envoltura viral, uniéndose con las membranas lipídicas, dando como resultado su desestabilización,

formación de poros y lisis. Sin embargo, la actividad antiviral, está principalmente relacionada a la capacidad de bloquear la penetración viral a sus células blanco por interacción con proteínas de membrana viral o interacciones con sus receptores en membranas del hospedero (Jenssen *et al.*, 2006; Castañeda *et al.*, 2009).

2.3.5.2. Actividad a nivel intracelular

El daño a nivel de la membrana, no es el único mecanismo que poseen los péptidos antimicrobianos para lograr la muerte celular de los diferentes microorganismos patógenos. Hay evidencia, que los AMPs poseen una importante actividad intracelular, o ya sea, de una forma sinérgica, ambas alternativas son vías para producir la lisis o ruptura celular. Se ha demostrado, que algunos péptidos antimicrobianos, tienen la capacidad de atravesar la membrana celular, e inhibir la función celular al unirse a los ácidos nucleicos. Buforin II, péptido antimicrobiano, originalmente aislado del sapo asiático, inhibe la función celular de *Escherichia coli*, uniéndose tanto al ADN y ARN; Las bacterenecinas producidas por bovinos inhiben la síntesis de ARN y de proteínas de *Klebsiella pneumoniae* (Giuliani *et al.*, 2007; Laverty *et al.*, 2011).

Algunos péptidos antimicrobianos, Tenecin-3 e Histatina, han demostrado tener un importante actividad antifúngica, alterando la actividad mitocondrial, que produce la pérdida de iones potasio y ATP intracelular (Castañeda *et al.*, 2009).

2.4. Defensinas

Las defensinas, su nombre le fue asignado debido a la importante función protectora que ejerce asociado al sistema de defensa del hospedero, es una gran familia de péptidos antimicrobianos, distribuidos ampliamente en mamíferos, insectos y plantas, además, son expresados por diferentes tipos celulares, principalmente células epiteliales y fagocitos (neutrófilos y macrófagos) (Ganz, 2003; Bagnica *et al.*, 2010).

Las defensinas de los mamíferos son péptidos de carácter catiónico, poseen un peso molecular de 4-5 kDa, conformado por 20 a 45 aminoácidos, relativamente ricos en

arginina. Poseen seis residuos de cisteínas que están unidos entre sí por puentes de disulfuro, los cuales son característicos de éstos (Ganz, 2004; Rivas-Santiago *et al.*, 2006; Hollox *et al.*, 2008).

Las defensinas contribuyen en la inmunidad innata, actuando inmediatamente después de una invasión microbiana, eliminando a los patógenos, éstos péptidos exhiben un amplio espectro de actividad antimicrobial, que incluye actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral. Entre otras funciones reconocidas, la capacidad de inducir maduración de células dendríticas, inducir secreción de cloro y citoquinas proinflamatorias de células epiteliales, y quimioatrayente de células inmune e inflamatorias, siendo un puente para la inducción de la respuesta adaptativa (Patil *et al.*, 2004; Bagnica *et al.*, 2010).

Más de 50 miembros de la familia de las defensinas han sido identificadas en especies mamíferas (De Yang *et al.*, 2001), en base al patrón de sus uniones puentes disulfuro entre sus cisteínas, se han clasificado en dos principales subfamilias, denominadas α -, β - defensinas, de los cuales se han identificado y realizado importantes estudios en diferentes mamíferos (Cunliffe y Mahida, 2004; Ganz, 2004). Sin embargo, una nueva subfamilia denominada θ - defensinas, se han identificado en leucocitos del primate (De Yang, *et al.*, 2002; Bagnica *et al.*, 2010). Tanto en humanos como en ratones, ambas subfamilias de defensinas: α -, β - defensinas, son codificadas por un grupo de genes del cromosoma 8, sugiriendo que las defensinas provienen de un común gen ancestral (Cunliffe y Mahida, 2004).

2.4.1. α - defensinas

Las α -defensinas poseen un peso molecular entre 3.5 a 4 KDa, están constituidas por una cadena de 29 a 35 residuos de aminoácidos y contienen tres puentes disulfuro en las posiciones: 1-6, 2-4, 3-5, característicos de la subfamilia (Oullette *et al.*, 2000; Oppenheim *et al.*, 2003; Rivas-Santiago *et al.*, 2009).

2.4.1.1. Distribución de las α -defensinas

Las α -defensinas fueron los primeros en ser encontrados en primates, lagomorfos, roedores y en diferentes mamíferos. Comprenden de 5-7% de todas las proteínas presentes en un neutrófilo maduro (Bagnica *et al.*, 2010), están presentes en macrófagos alveolares de conejos, y células de Paneth del intestino delgado de muchos mamíferos y roedores (llamadas criptidinas) (Bevins, 2005; Ayabe *et al.*, 2001).

Las α -defensinas son almacenadas como proformas inactivas o formas activas maduras en los gránulos citoplasmáticos de fagocitos y células de Paneth, y secretados (y procesados si es necesario) en respuesta a infecciones microbiales (Patil *et al.*, 2004; Tanabe *et al.*, 2004).

Se han identificado seis α -defensinas en humanos, que comprenden cuatro defensinas de neutrófilos (HNP-1, -2, -3, -4) y dos defensinas entéricas (HD-5, -6). Otras α -defensinas están abundantemente expresadas en células de Paneth de las criptas del intestino delgado de ratones. Recientemente la α -defensina no hematopoyética HD-5 ha sido también detectada en el epitelio del tracto genital (Cunliffe y Mahida, 2004; Bevins, 2005).

2.4.1.2. Estructura génica de las α -defensinas

Las α -defensinas son codificadas por genes altamente conservados (Ouellette, 1999). Los genes de α -defensinas de origen mieloide tienen tres exones: el exón 1 codifica la región no traducida 5' (5' UTR); el exón 2, la secuencia señal; y el exón 3, el péptido maduro. Los genes de α -defensinas de origen epitelial están codificados por genes que consisten de dos exones: el exón 1, codifica la región no traducida 5' (5' UTR), la secuencia señal y el propéptido; y el exón 2, el péptido maduro (Cunliffe y Mahida, 2004).

2.4.1.3. Síntesis de α -defensinas

Las α -defensinas son producidas como propéptidos de 80-105 aminoácidos, cada uno compuesto de una corta secuencia señal NH₂-terminal, de aproximadamente 20 aminoácidos, un prosegmento aniónico de 40-50 aminoácidos y un péptido maduro catiónico COOH-terminal de 30-35 aminoácidos aproximadamente; y son subcelularmente cortados y proteolíticamente procesados a péptidos activos. La enzima responsable del procesamiento y activación de las α -defensinas entéricas es la metaloproteinasa matrilisina (MMP7), que es abundantemente expresada en células de Paneth de intestino delgado en ratones, mientras que, la tripsina es la enzima encargada del procesamiento de las α -defensinas en humanos (Patil *et al.*, 2004).

La mayoría de las defensinas de las células fagocíticas maduras parecen ser completamente procesados a través de clivaje primario. Los precursores de α -defensinas humanas son clivadas secuencialmente en un periodo de 4-24 horas, a péptidos intermedios de 56 - 75 aminoácidos y agentes que neutralizan el compartimiento subcelular ácido. La carga aniónica de los prosegmentos de muchos precursores de α -defensinas, sugieren que tiene un rol en neutralizar la carga básica del péptido funcional (Patil *et al.*, 2004; Rivas -Santiago *et al.*, 2009).

Las α -defensinas de origen mieloide son sintetizadas en la médula ósea, en los promielocitos, así los neutrófilos maduros que circulan en la sangre o se encuentran en tejidos inflamados contienen grandes niveles de defensinas, pero no están sintetizando los péptidos o sus ARN mensajeros (ARNm) (Ganz, 2003).

2.4.1.4. Regulación de la síntesis y expresión de las α -defensinas

La síntesis y secreción de las α -defensinas está regulado por señales microbiales, señales medioambientales, citoquinas y en algunos casos señales neuroendocrinas, como los agonistas colinérgicos en tejidos específicos (Ayabe *et al.*, 2001). Las α -defensinas de neutrófilos humanos son sintetizadas constitutivamente por precursores de la médula ósea de neutrófilos durante estadios de diferenciación tempranos (promielocitos). Habiendo madurado en la médula ósea y ensamblado su arsenal de

gránulos, los neutrófilos cesan la síntesis y secretan los gránulos en la sangre y médula ósea. Los receptores específicos y las vías de traducción de señal, que regulan la síntesis de las α -defensinas son aún desconocidas, sin embargo, la región promotora de los genes de defensinas humanas contienen grandes características de sitios de unión a factores transcripcionales mieloides, que son importantes para la transcripción de líneas celulares mieloides (Ganz, 2003).

2.4.2. β - defensinas

En 1991 Diamond y colaboradores aislaron un péptido antimicrobiano a partir de la lengua de vaca, al que denominaron péptido antimicrobiano traqueal (TAP), que luego, sería integrante de una nueva subfamilia, las β - defensinas (Rivas-Santiago *et al.*, 2009), posteriormente, su expresión ha sido observada en una gran cantidad de superficies epiteliales de animales, incluyendo humanos (Cunliffe y Mahida, 2004). Las β - defensinas son más grandes que las α -defensinas, con 36 a 42 residuos aminoacídicos y además difieren en la localización y espaciamiento de sus residuos de cisteína: 1-5, 2-4, 3-6 (Ganz, 2003).

2.4.2.1. Distribución de las β - defensinas

Existen al menos 60 miembros de esta familia, de los cuales 43 son de mamíferos, seis de aves y 11 de reptiles y marsupiales (Rivas-Santiago *et al.*, 2009), la mayoría de β - defensinas son producidas por células que recubren superficies epiteliales. Las β -defensinas han sido encontradas en monos, ratas, ratones, pollos, cerdos y bovinos, en los que se ha determinado muchas β - defensinas codificadas por muchos genes, como el péptido antimicrobiano lingual (LAP), TAP y en el intestino (β - defensina entérica, EBD) (Ganz, 2003).

Dos tipos de β - defensinas humanas han sido principalmente estudiados por su participación a nivel gastrointestinal, β - defensina humana 1 (hBD-1) es expresada en células epiteliales de una gran variedad de superficies mucosas, incluyendo grandes regiones de el tracto gastrointestinal, mucosa oral, glándula salival, estómago, colon,

hígado y páncreas (Cunliffe y Mahida, 2004), y la β - defensina 2 (hBD-2), la primera β - defensina, en la cual se demostró que su expresión estaba sobre regulada con el contacto con microorganismos (Hamanaka *et al.*, 2001).

2.4.2.2. Estructura génica de las β - defensinas

De manera similar a las α -defensinas de origen epitelial, las β - defensinas son codificadas por dos exones, las que codifican a las preproproteínas de las β - defensinas. El producto precursor del gen de las β - defensinas es procesado a un péptido maduro de 36-42 aminoácidos por un mecanismo que aún no ha sido caracterizado (Cunliffe y Mahida, 2004). El exón 1 codifica la región no traducida 5' (5' UTR), el propéptido y la secuencia señal; y el exón 2 codifica el péptido maduro y la región no traducida 3' (3' UTR) (Weinberg *et al.*, 1998).

2.4.2.3. Síntesis de β - defensinas

Las β - defensinas epiteliales de las vías aéreas de bovinos, son sintetizadas cuando son expuestos a bacterias inhaladas o lipopolisacáridos. Esta respuesta es iniciada por receptores de lipopolisacáridos que sirven de señalización a reguladores transcripcionales incluyendo el complejo transcripcional NF- κ B.

Al igual que las α - defensinas, las β - defensinas son sintetizadas como precursores largos y que son secretados luego de procesamiento proteolítico (Ganz, 2003). La síntesis y expresión de la hBD-1 es constitutiva, en contraste, la hBD-2 es regulada por estímulos infecciosos e inflamatorios (Rivas-Santiago *et al.*, 2006).

2.4.2.4. Regulación de la síntesis y expresión de las β - defensinas

La defensina hBD-1, es expresada constitutivamente tanto por queratinocitos como por células epiteliales a nivel del tracto gastrointestinal. Sin embargo, la gran mayoría de β - defensinas, son inducibles por estímulos infecciosos o inflamatorios (ej. hBD-2, hBD-3 y hBD-4) (Oppenheim *et al.*, 2003). Los mecanismos por el cual los genes de β -

defensinas pueden ser regulados han sido estudiados exhaustivamente *in vitro*. La mayoría de genes de β - defensinas inducibles contienen sitios de reconocimiento para factores de transcripción nuclear como NF- κ B y NF-IL-6. La inducción de la expresión puede hacerse por una variedad de estímulos incluyendo bacterias, LPS, y citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Cunliffe y Mahida, 2004). Las β - defensinas de células epiteliales bovinas en la tráquea, lengua e intestinos sirvió como un modelo inicial para las defensinas que fueron inducidas por estímulos inflamatorios e infecciosos. La producción de β - defensina traqueal bovina (TAP) es transcripcionalmente regulado vía NF- κ B (Ganz, 2003)

2.4.3. Defensinas en camélidos sudamericanos

Estudios recientes en alpacas (*Vicugna pacos*) han determinado la presencia y expresión de los genes de las α - y β - defensinas en muestras de mucosa intestinal y sangre de alpacas. La detección genómica de la α -defensina de alpaca, denominada *Defa 8*, fue realizado a través de un estudio comparativo de genes de α -defensinas en roedores y humanos. Mientras que, la β - defensina, *β - def alp*, demostró tener un alto grado de identidad con otras secuencias de defensinas filogenéticamente relacionadas, debido a que se utilizó primers diseñados a partir de secuencias de β -defensinas de bovinos, como es el de la β -defensina 4 y 5 (More *et al.*, 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Se utilizaron 29 animales enfermos (enteropatías), crías de alpacas de 0 a 45 días de edad, de variedad Suri y Huacaya, de ambos sexos, provenientes del departamento de Cusco, provincia de Canchis, distrito de Maranganí.

3.2. Obtención y almacenamiento de muestras

Las muestras fueron tomadas inmediatamente después del sacrificio de los animales, las cuales fueron seccionadas del intestino delgado, tomándose 02 cortes de 2 cm. de longitud de yeyuno.

Las secciones fueron lavadas en suero fisiológico estéril al 0.9%, para retirar el contenido intestinal. Uno de los cortes se almacenó en nitrógeno líquido a -196°C hasta su procesamiento, mientras que, el segundo corte, se conservó en formol al 10%, para su evaluación histopatológica.

3.3. Procesamiento de muestras

3.3.1. Procesamiento de muestras para histopatología

Los cortes obtenidos de yeyuno de crías enfermas, adyacentes a los cortes hechos para la técnica molecular, fueron deshidratados a través de sucesivas inmersiones en alcohol etílico a diferentes concentraciones, aclaradas en Xilol, sumergidas en parafina líquida para luego ser colocadas en refrigeración hasta lograr su solidificación y finalmente ser cortadas, con la ayuda de un microtomo en secciones de 5 micras de espesor. Las láminas fueron coloreadas con Hematoxilina-Eosina (H-E) a fin de proceder a su posterior lectura histopatológica en el microscopio óptico Axisotar (Zeiss - Alemania).

3.3.2. Procesamiento de muestras para la evaluación molecular

Las muestras de tejido fueron descongeladas bajando la temperatura de forma paulatina desde -196°C a -20°C , luego a -4°C , para luego realizar el raspado profundo de la mucosa con hoja de bisturí. El raspado fue diluido en 1 ml de suero fisiológico estéril y centrifugado a 3000 RPM por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior. El pellet fue reconstituido en 500 μl de agua libre de nucleasas.

3.4. Expresión de α - y β - defensinas:

3.4.1. Extracción de ARN total

Para evaluar la expresión de α - y β - defensinas, se procesaron las muestras con el Kit PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System de la marca PROMEGA, para la obtención de los ARN mensajeros totales. El procedimiento se detalla a continuación:

- a) Se colocó 250 µl. de las muestras en tubos Eppendorf de 2ml, y se le agregó 175µl de buffer de lisis + BME (Anexo A.1.), se procedió a agitar por 45 segundos. Se adicionó 350 µl de buffer de dilución (RDA) y se mezcló por inversión 3 a 4 veces. Se envió a centrifuga a 12000g por 10 minutos.
- b) Se transfirió 750 µl de sobrenadante en un tubo Eppendorf libre de nucleasas. Se adicionó 200 µl de etanol al 95%. Se mezcló y se llevó a vórtex ligero.
- c) Se transfirió 700 µl de la mezcla al cartucho pre insertado al tubo de colección del kit (PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System).
- d) Se procedió a centrifugar a 12000g por 15 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el fluido del tubo de colección. Se agregó 600 µl de solución de lavado de ARN (RWA), sobre el cartucho pre insertado. Se centrifugó a 12000g por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el fluido y el tubo de colección.
- e) Se colocó el cartucho en el tubo de lavado del kit (PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System). Se agregó 50 µl de DNAsa (Anexo A.2.) ya preparada directamente a la membrana. Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
- f) Se adicionó 200 µl de solución de parada de DNasa (DSA) (+ etanol) y se centrifugó por un minuto a 12000g. Se añadió 600 µl de solución de lavado de ARN, luego se procedió a centrifugar a 12000g por 1 minuto a temperatura ambiente. Se eliminó el fluido del tubo y se agregó 250 µl de solución de lavado de ARN, centrifugándose luego, por 2 minutos a temperatura ambiente.
- g) Se eliminó el fluido y el tubo de lavado, y se colocó el cartucho en un tubo de recuperación del kit (PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System).
- h) Se procedió a eluir el ARN, agregando 75 µl de agua libre de nucleasas. Se dejó incubar por un minuto para luego centrifugar por 2 minutos a 12000g a temperatura ambiente.
- i) Luego se procedió a alicuotar el ARN en tubos de 500 µl, cada uno con 25 µl de ARN. Se almacenó en nitrógeno líquido a -196°C, hasta su procesamiento para RT – PCR.

3.4.2. Síntesis de cDNA (Transcripción reversa)

El ARNm total obtenido de los raspados yeyunales fue empleado como molde para la síntesis de cDNA mediante el kit *cDNA superscript III supermix* de la marca INVITROGEN.

Se preparó el Master mix, como sigue:

2x RT Reaction mix	10 µl x n (n: número de muestras)
RT enzyme mix	2 µl x n
DEPC – treated water	7 µl x n

Se colocó 19 µl del master mix (que incluyen los oligos dT y hexámeros al azar) y 1 µl de muestra (ARN), para obtener un volumen de reacción de 20 µl. Las muestras fueron llevadas al termociclador donde se siguió el siguiente protocolo: 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 30 minutos, 85 °C por 5 minutos y luego a 4 °C. Se añadió 1 µl de RNasa H a cada pocillo y se incubó a 37 °C por 20 minutos. Luego de esto se obtiene el cDNA que va a servir de molde para la reacción de PCR.

3.4.3. PCR Tiempo Real

El RT-PCR en tiempo real fue realizada en un termociclador equipado con un monitor de detección de fluorescencia de la marca *MJ Research – BioRad*, usando el agente intercalante “sybr green”, que se intercala entre el ADN de doble hebra, permitiendo de esta forma, la evaluación de la amplificación “ciclo por ciclo”. Para esto se utilizó el ADN complementario (cDNA) de los ARN mensajeros obtenidos en el paso anterior (Transcripción reversa). Se emplearon los cebadores específicos mencionados anteriormente. Se utilizó el kit *Sybr green super mix* de la marca INVITROGEN.

Se preparó un master mix, como se detalla a continuación:

Sybr green super mix	10 µl x n
Primer Forward (10 µM)	0.4 µl x n

Primer Reverse (10 μ M)	0.4 μ l x n
ROX diluido (1:10)	1 μ l x n
Agua libre de nucleasas	7.2 μ l x n

Se procedió a dar un ligero vórtex de 2 – 3 segundos para homogenizar el mix. Se colocó 19 μ l del master mix en viales para PCR y 1 μ l de cDNA molde. Se llevó al termociclador y se corrió la PCR con el protocolo siguiente: 50 °C por 2 minutos (Incubación con UDG), 95 °C por 10 minutos (Inactivación UDG y activación de DNA polimerasa), seguido de 40 ciclos de: 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto. Los resultados fueron apreciados en el software Opticon Monitor 2.1.

Se emplearon los cebadores diseñados por Patil *et al.* 2004, proveniente de α -defensinas en roedores y humanos, que fue utilizado por More *et al.* (2011), para la detección y expresión genómica de la α -defensina, *Defa 8*, en alpacas (*vicugna pacos*):

Defa8 FW: GAAGACACTTGTCTCCTTTCTG

Defa8 RV: AATAGACCTGGACGACAGGACC

Estos oligonucleótidos generan un producto de 258pb con una temperatura de disociación teórica de 81.74 °C.

Se emplearon oligonucleótidos diseñados por More *et al.* (2011) mediante el programa Primer3 Output y Primer Blast a partir de secuencias publicadas en el Banco de Genes (GenBank) para bovinos (Acceso: AF016539.1), utilizados para la detección y expresión genómica de Beta defensina, (β - *def alp*):

Beta Entérica FW: TCCATAGATGGGACACAGCA

Beta Entérica RV: TCCTCTCTTCCTGCCACTGT

Estos oligonucleótidos generan productos de 226pb.

Para la reacción de PCR Tiempo Real, se usó 0.2uM de cada uno de los oligonucleótidos con el protocolo sugerido por el Kit (50°C por 2 min, 95°C por 10 min, y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto), empleando 1ul de

cDNA de cada una de las muestras en reacciones independientes de 20ul de volumen final.

3.4.4. Cuantificación relativa α - y β - defensinas:

Los resultados de RT-PCR tiempo real se pueden presentar como cuantificaciones absolutas o relativas (Pfaffl, 2001). En la cuantificación absoluta se requiere la preparación de curvas patrón estándar con cantidades exactas del producto a analizar. La cuantificación relativa permite el análisis de resultados de una forma mucho más sencilla usando métodos matemáticos (Pfaffl, 2001).

La cuantificación relativa de los resultados de α - y β - defensinas (*Defa 8* y *β - def alp*) se realizó con el Método Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) o también llamado Método Ct comparativo (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Applied Biosystems, 2001; Rebrikov y Trofimov, 2006). El método se basa en el análisis comparativo de los Cts de las muestras, comparados con el Ct de un control endógeno (en el presente estudio, los Cts de las muestras usando el set de primers *GAPDH*). La fórmula se presenta a continuación:

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

N = Cantidad relativa de ARNm con respecto al calibrador

$\Delta\Delta Ct$ = Diferencia entre el control endógeno y el ARNm a analizar con respecto al calibrador

En este método los resultados son presentados como cantidades en número de veces con respecto a un calibrador (generalmente un individuo de la muestra con cantidades basales de expresión del gen a analizar). De esta forma se obtuvo los niveles de expresión de α - y β - defensinas (*Defa 8* y *β - def alp*) con respecto a un calibrador, usado para la cuantificación en crías de alpacas sanas (More *et al.*, 2011)

(ver Cuadro A.1. y A.2.), considerando como tal, al promedio de los niveles de expresión de las muestras con menor edad (0 días de edad).

Las cantidades relativas promedio de las muestras fueron agrupadas por edad en semanas como se muestra a continuación:

Grupo 1:	Crías de alpaca de 0 días de edad (Calibrador)
Grupo 2:	Crías de alpaca de 1 a 7 días de edad
Grupo 3:	Crías de alpaca de 8 a 14 días de edad
Grupo 4:	Crías de alpaca de 15 a 21 días de edad
Grupo 5:	Crías de alpaca de 22 a 28 días de edad
Grupo 6:	Crías de alpaca de 29 a 35 días de edad
Grupo 7:	Crías de alpaca de 36 a 45 días de edad

3.5. Análisis estadístico

Para la comparación entre grupos sanitarios: Sanos y enfermos, se utilizó el estudio realizado por More et al, (2011), en el cual se evaluó la expresión relativa de las α - y β -defensinas (*Defa 8* y *β - def alp*) en crías de alpacas sanas, por ser animales procedentes de la misma área de crianza y con las mismas condiciones ambientales (Cuadro A.1. y A.2.).

La diferencia de expresión de ambas defensinas entre los grupos sanitarios (sanos y enfermos con enteropatía) se analizó mediante la prueba de T de Student. Para evaluar la diferencia de expresión de ambas defensinas entre los grupos etarios se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor y posteriormente la prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar los grupos diferentes. Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico STATA versión 11.0 estableciendo la significación estadística en 0.05.

IV. RESULTADOS

4.1. GAPDH

4.1.1. Expresión de GAPDH

Se realizó el RT-PCR en tiempo real de la totalidad de las muestras utilizando el set de cebadores específicos para el gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa), el cual fue usado como control interno o endógeno de las muestras. Los resultados mostraron que el 100% de las muestras (29/29) tuvieron un Ct (ciclo umbral) antes de los 40 ciclos de amplificación. Los valores de este Ct variaron dentro de un rango de 27.05 a 32.24 (Cuadro A.3. y A.4.). Amplificando una región del ADNc (obtenida por transcripción reversa de los ARN mensajeros totales) de 360 pb aproximadamente, lo que se evidencia como una banda única en el gel de agarosa luego de la corrida electroforética (figura 1).

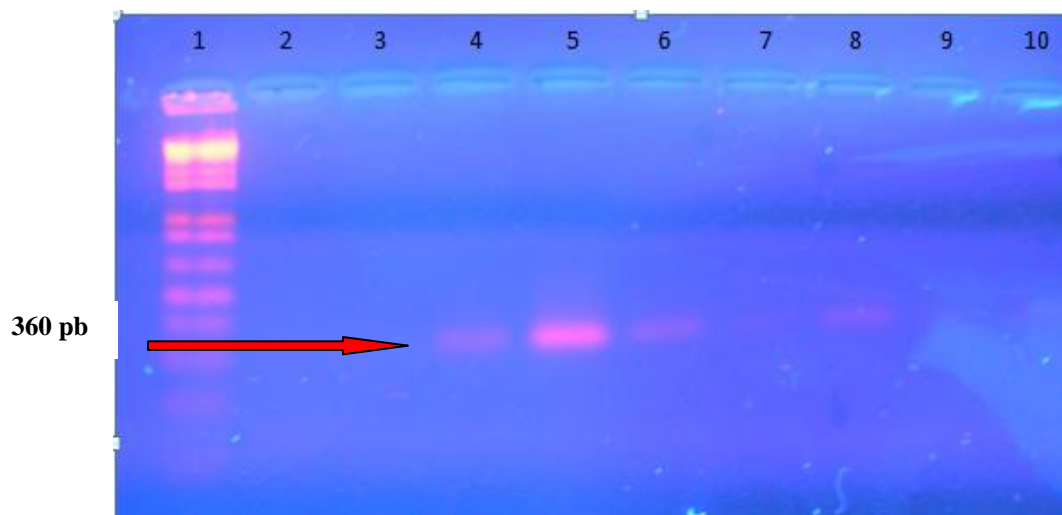


Figura 1. Electroforesis de productos amplificados con el set de oligonucleótidos GAPDH. Carril 1: *Perfect DNA 100bp Ladder* de Novagen; Carriles 4-9: Mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas.

La temperatura de disociación (T_m) de los productos indicó la presencia de dos tipos de productos específicos en la población muestreada. El primer tipo con una T_m entre 83°C y 83.9°C; y el segundo, entre 80.9°C y 81.5°C (Figura 2)

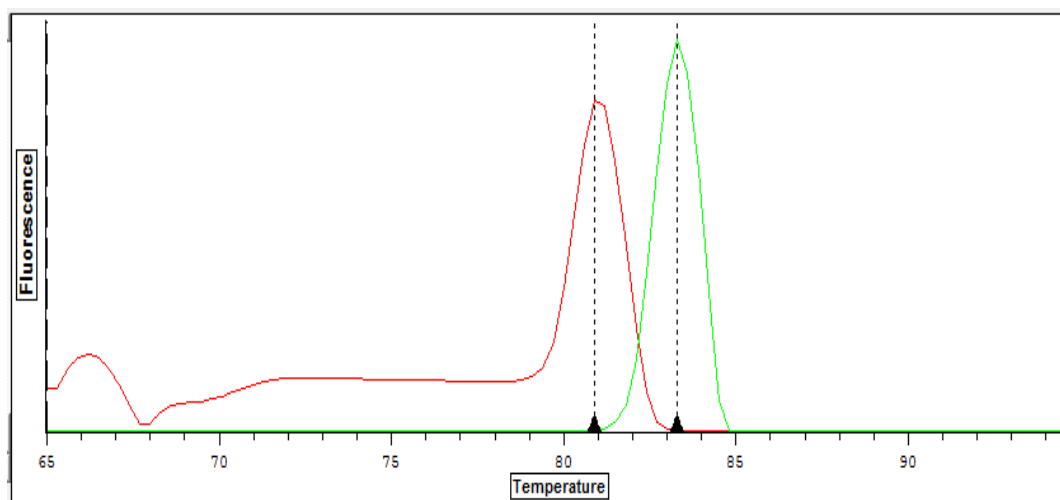


Figura 2. Curva de disociación (T_m) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos GAPDH a partir de mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas. La curva roja representa un producto específico con T_m de 80.9°C mientras que la curva de color verde muestra un producto con T_m entre 83.3°C.

4.2. *Defa 8* (α -defensina)

4.2.1 Expresión de *Defa 8* (α -defensina)

Los resultados del RT-PCR tiempo real usando el set de primers *Defa 8* se consideraron positivas aquellas muestras con una curva de amplificación clara, y una curva de disociación única sin ruido de fondo que representen productos inespecíficos. El análisis mostró curvas de amplificación con un ciclo umbral (Ct) entre 30.28 y 36.33 con un promedio de 34.08. El análisis de la curva de disociación mostró un pico único, con un leve ruido de fondo y una temperatura de disociación entre 80.3 y 85.6 °C. El gráfico de Ct y la curva de disociación se muestran en las figuras 3 y 4 respectivamente.

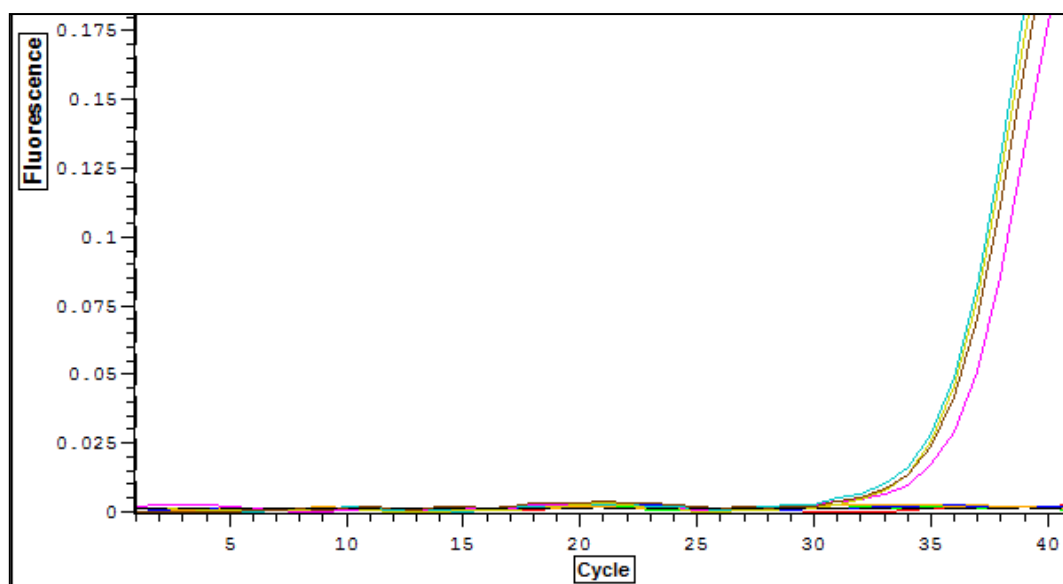


Figura 3. Curva de amplificación (Ct) de *Defa 8* (α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas. Las muestras tienen un Ct de 30.28 a 36.33.

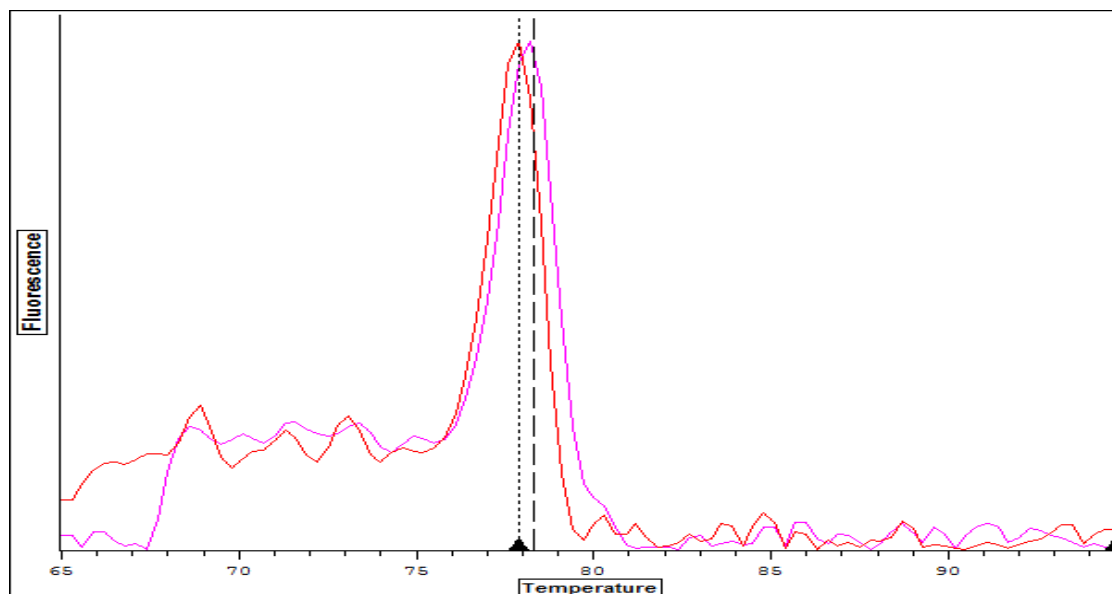


Figura 4. Temperatura de disociación de los productos amplificados de *Defa 8* (α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas. Las Temperaturas de disociación de los productos amplificados se encuentran entre 80.3 y 85.6 °C.

4.2.2 Cuantificación relativa de *Defa 8* (α -defensina)

Los resultados de la cuantificación relativa que utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, demostraron que los niveles promedio de expresión de *Defa 8* fueron mayores en el grupo de crías enfermas frente al grupo de crías sanas en relación a los animales de cero días de edad que no consumieron calostro (calibrador) (Cuadro A.3.). Las crías enfermas mostraron una expresión de *Defa 8* correspondiente a 18.15 veces lo expresado por el calibrador, mientras que las crías sanas expresaron sólo 4.68 veces lo expresado por el calibrador (Figura 5). Se demostró la significancia estadística de la diferencia entre los grupos sanitarios mediante la prueba de T de student ($P < 0.05$).

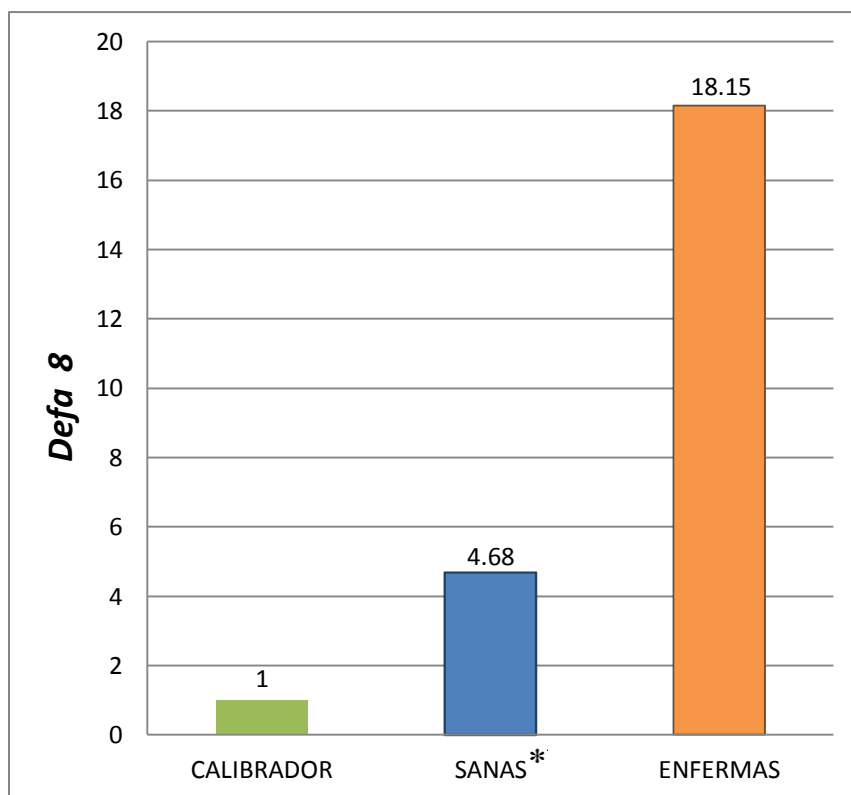


Figura 5. Niveles de expresión de *Defa 8* (α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas. Existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos enfermos y sanos).

*Datos de More *et al*, (2011).

Los resultados obtenidos en crías de alpaca enfermas muestran niveles de expresión relativa de *Defa 8* con una tendencia creciente en las primeras 2 semanas de vida, expresando 14.81 y 24.03 veces el calibrador en la primera y segunda semana de edad respectivamente. Posteriormente disminuye los valores de expresión en la tercera semana (8.91 veces el calibrador). Luego poseen una tendencia decreciente en la semana 4 y 5 de vida, expresando respectivamente 29.41 y 11.82 veces el calibrador y finalmente los valores alcanzan su valor máximo en la última semana (43.47 veces el calibrador) (Figura 6). No existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos mediante la prueba de ANOVA de un factor ($P < 0.05$).

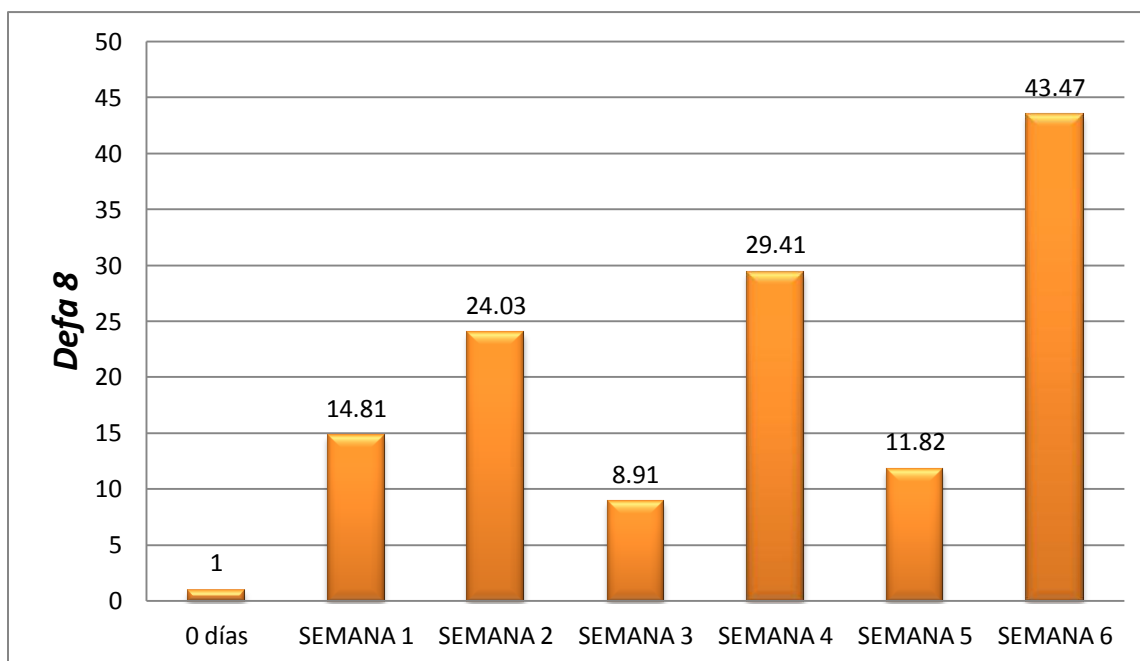


Figura 6. Niveles de expresión de *Defa 8* (α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas por semanas de edad. La figura muestra diferentes niveles de expresión, sin tener diferencia significativa mediante la prueba de ANOVA de un factor ($P < 0.05$).

Al contrastar la expresión de *Defa 8* del grupo de animales sanos con el de enfermos se evidenció, dos cinéticas de expresión diferentes hasta la sexta semana. En los animales sanos se observó una marcada tendencia creciente seguida de una caída sostenida, mientras que en los enfermos la cinética no parece seguir una tendencia definida (Figura 7). No se encontró diferencia estadísticamente significativa de expresión entre animales sanos y enfermos en todos los grupos etarios según la prueba de T de Student.

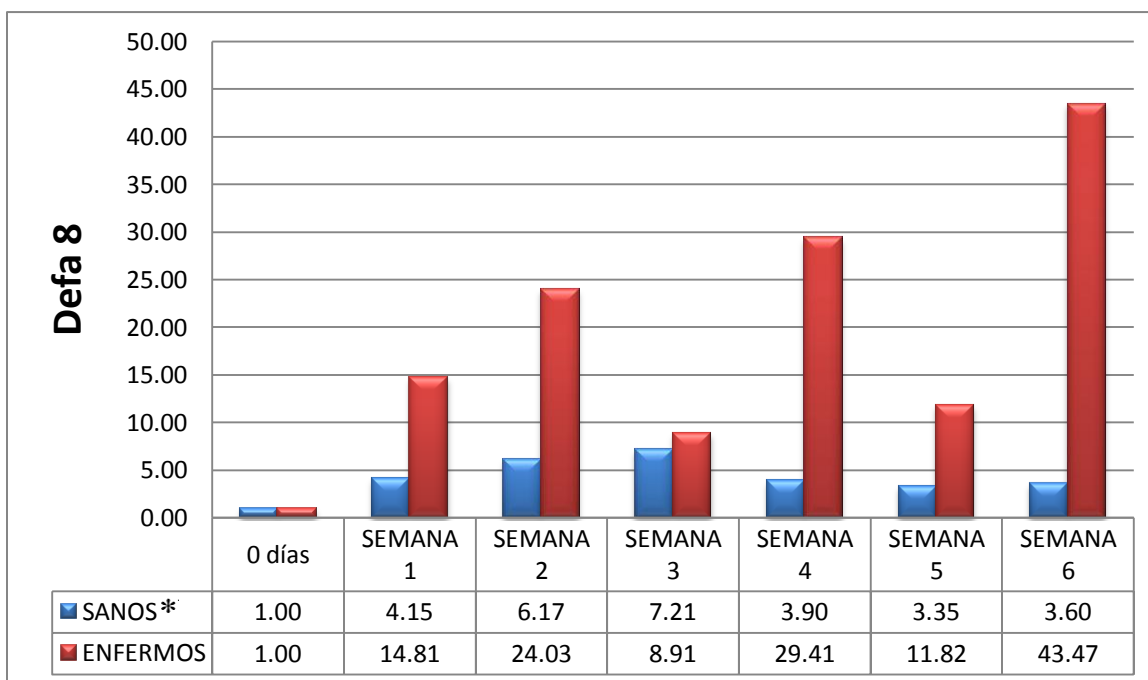


Figura 7. Niveles de expresión de *Defa 8*(α -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas por semanas de edad. La figura muestra niveles mayores de expresión al comparar sanos con enfermos en todos los grupos etarios, sin embargo, no existe diferencia significativa ($P < 0.05$) según la Prueba T de Student.

*Datos de More *et al*, (2011).

4.3 β -def alp (β -defensina)

4.3.1 Expresión de β -def alp (β -defensina)

Los resultados en la expresión de β def Alp, mostraron la amplificación de un producto único, específico, el cual se representa como un pico de disociación único y claro en el gráfico de curva de disociación; y una curva de amplificación para cada una de las muestras; las curvas de amplificación tuvieron un rango de 26.43 y 33.88 con un promedio de 29.37 (Cuadro A.4.). Los gráficos de curva de disociación y de amplificación se muestran en las figuras 8 y 9 respectivamente.

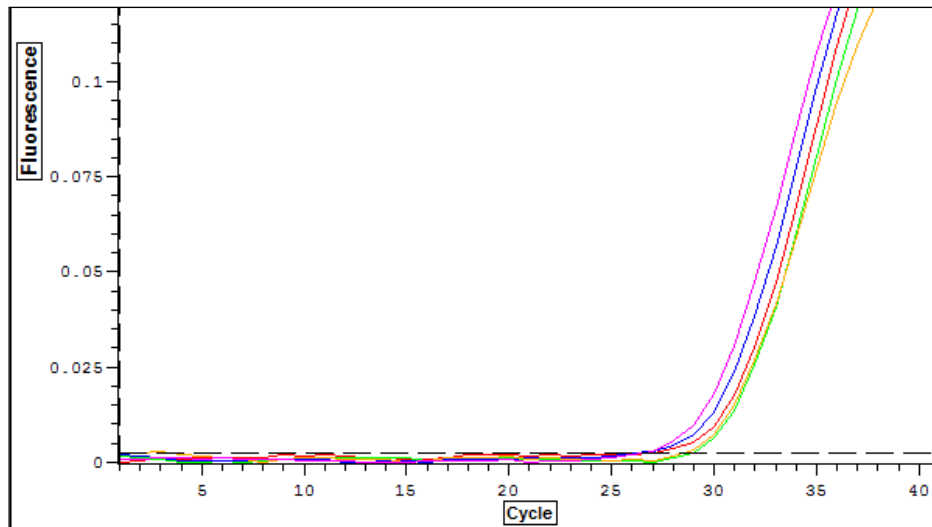


Figura 8. Curva de amplificación (Ct) de los productos amplificados con el set de primers β -def alp. Se observa los Cts de los productos amplificados β def Alp. Los productos tuvieron un Ct entre. 26.43 y 33.88.

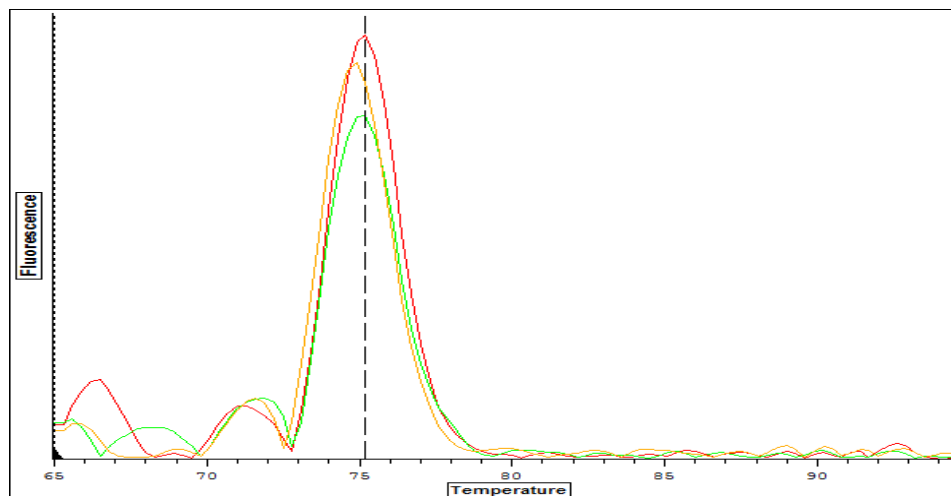


Figura 9. Temperatura de disociación de los productos amplificados con el set de primers β - def alp. Tm de los productos de amplificación por RT-PCR tiempo real, con los cebadores diseñados en el presente estudio, en base a una secuencia de bovino, denominados β - def alp.

4.3.2 Cuantificación relativa de β -def alp (β -defensina)

Los resultados de la cuantificación relativa que utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, demostraron que los niveles promedio de expresión de β -def alp fueron mayores en el grupo de crías enfermas frente al grupo de crías sanas en relación a los animales de cero días de edad que no consumieron calostro (calibrador). Las crías enfermas mostraron una expresión de β -def alp correspondiente a 258.29 veces lo expresado por el calibrador, mientras que las crías sanas expresaron sólo 4.11 veces lo expresado por el calibrador (Figura 10). Se demostró la significancia estadística de la diferencia entre los grupos sanitarios mediante la prueba de T de student ($P < 0.05$).

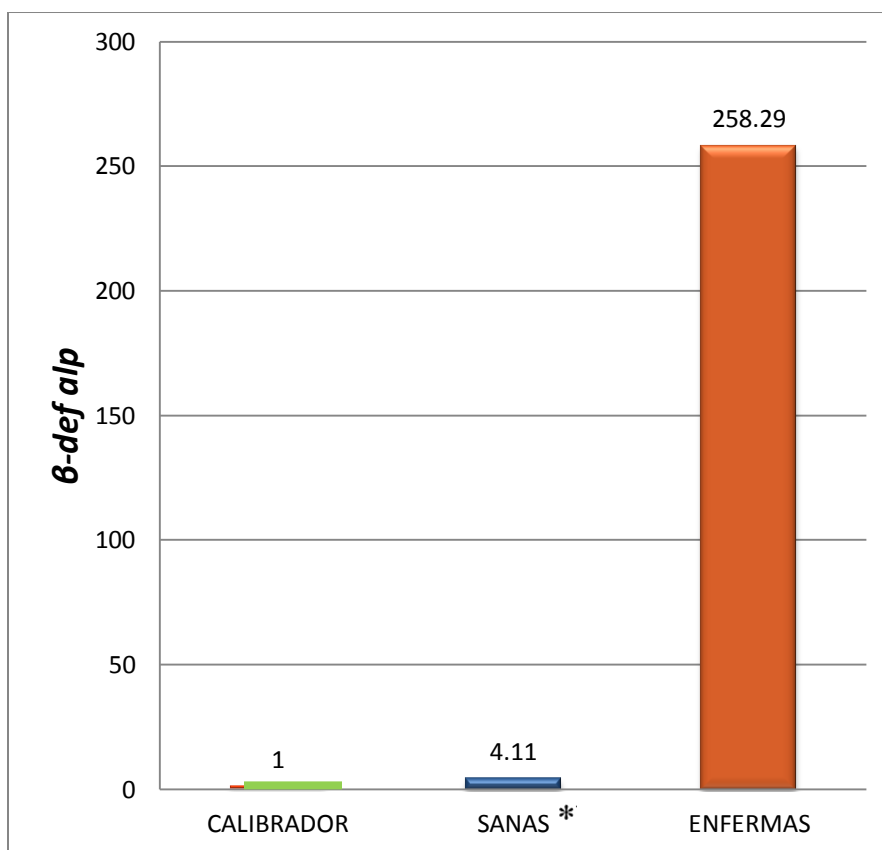


Figura 10. Niveles de expresión de β -def alp (β -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas y sanas. Existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos enfermos y sanos.

* Datos de More *et al*, (2011).

Los resultados obtenidos en crías de alpaca enfermas muestran niveles de expresión relativa de β -def alp con una tendencia creciente en las primeras 2 semanas de vida, expresando 213.61 y 379.32 veces el calibrador en la primera y segunda semana de edad respectivamente. Posteriormente disminuyen los valores de expresión en la tercera semana y cuarta semana; 366.63 y 173.45 veces el calibrador, respectivamente. Luego poseen una tendencia decreciente en la semana 4 y 5 de vida, expresando respectivamente 173.45 y 189.55 veces el calibrador y finalmente los valores alcanzan su valor menor en la última semana (108.56 veces el calibrador (Figura 11). Al realizar la prueba ANOVA de un factor ($P < 0.05$) se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos etarios.

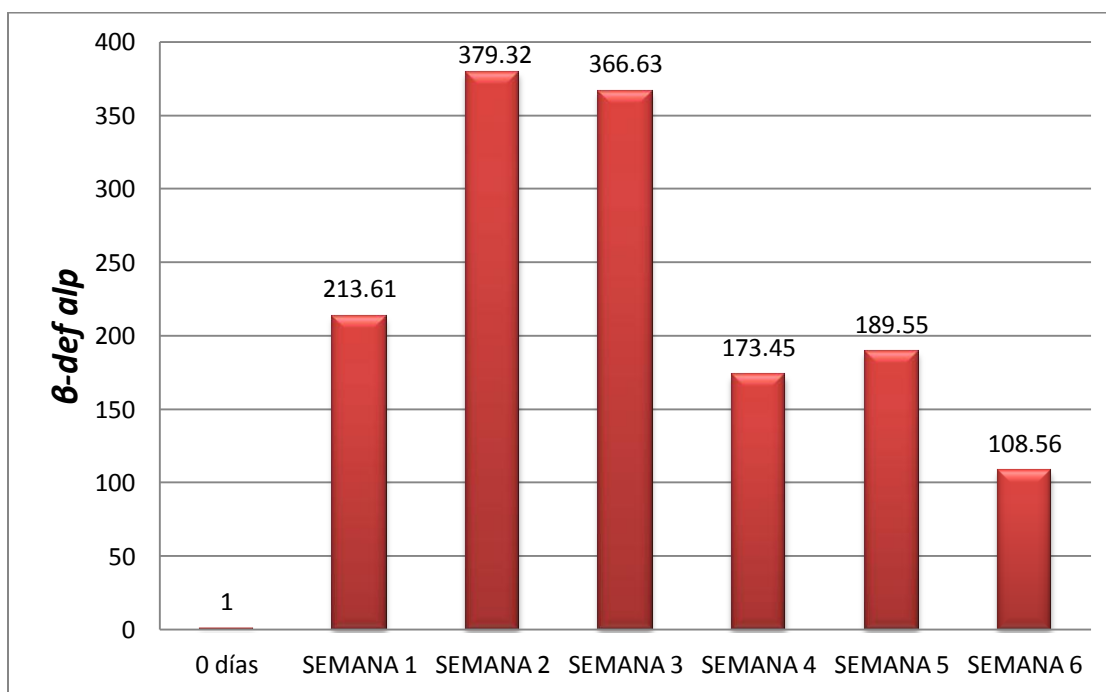


Figura 11. Niveles de expresión de β -def alp (β -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas por semanas de edad. La figura muestra diferentes niveles de expresión, sin tener diferencia significativa mediante la prueba de ANOVA de un factor ($P < 0.05$).

Al contrastar la expresión de β -def alp del grupo de animales sanos con el de enfermos se evidenció, dos cinéticas de expresión diferentes hasta la sexta semana. En los animales sanos se observó una marcada tendencia creciente seguida de una caída sostenida, mientras que en los enfermos la cinética no parece seguir una tendencia definida (Figura 12). La diferencia de expresión entre animales sanos y enfermos fue estadísticamente significativa en todos los grupos etarios según la prueba de T de Student; a excepción de los grupos de la cuarta semana.

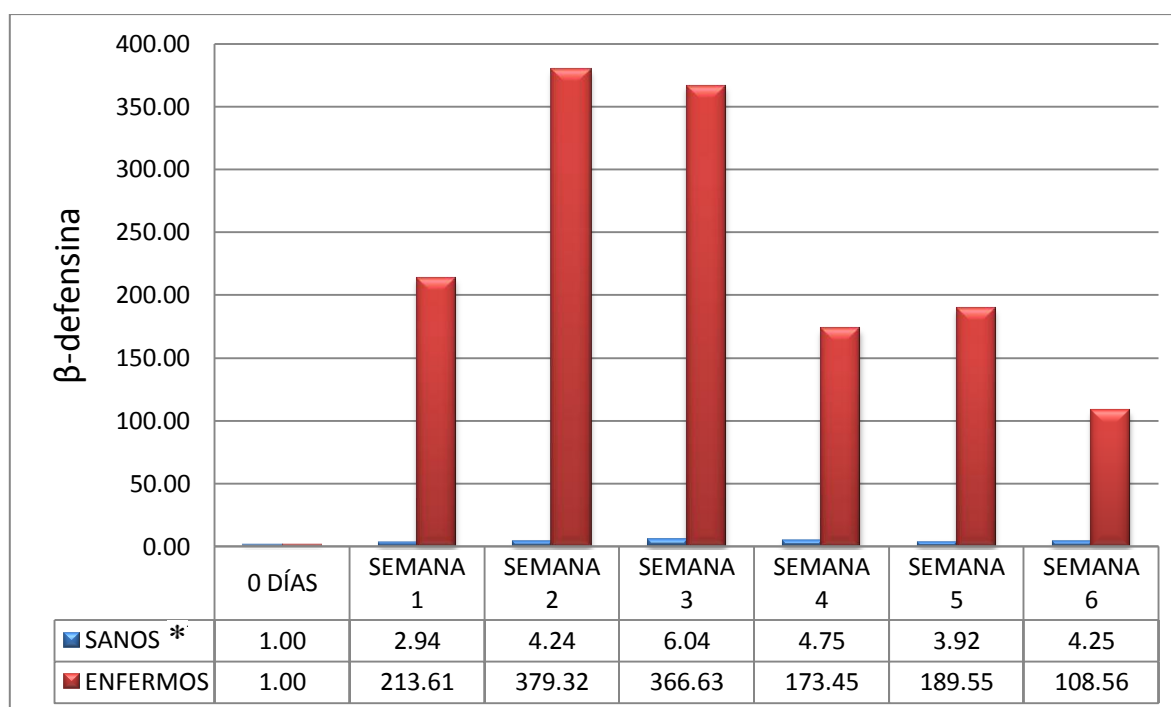


Figura 12. Niveles de expresión de β -def alp (β -defensina) en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas por semanas de edad. La figura muestra niveles mayores de expresión al comparar sanos con enfermos en todos los grupos etarios, determinándose diferencia significativa ($P < 0.05$) según la Prueba T de Student; a excepción del grupo de la cuarta semana.

* Datos de More *et al*, (2011).

4.4 Estudio histopatológico

El estudio histopatológico de las porciones de yeyuno de las crías enfermas, mostró que la lesión histológica más frecuente fue la enteritis necrótica difusa aguda, presente en

27 animales, 01 muestra con el diagnóstico de enteritis catarral difusa aguda y 01 con calcificación distrófica (Figura 13).

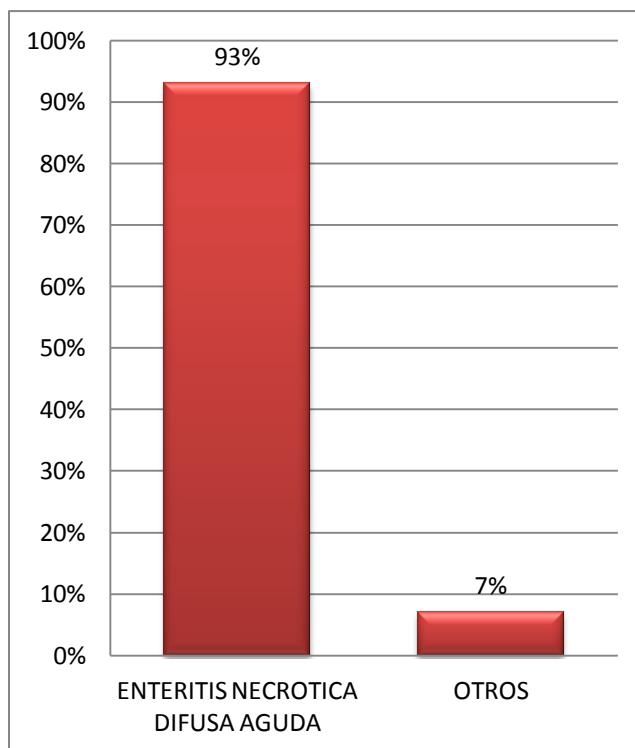


Figura 13. Frecuencia de lesiones histopatológicas en mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas con enteropatía.

La lesión más frecuente se pudo subclasificar a su vez en cuatro diagnósticos lesionales: enteritis necrótica difusa aguda presente en 16 animales, enteritis necrótica difusa aguda asociada a bacterias presente en 7 animales, enteritis necrótica difusa aguda asociada a parásitos presente en 4 animales (asociado a *Eimeria spp.* en 2 animales y a *Cryptosporidium sp.* en 2 animales) (Figura 14). La clasificación de enteritis necrótica aguda abarca aquellas muestras en la que el patógeno causal no fue evidente, sin embargo esto pudo estar influenciado por el corte histológico, por el curso o distribución de la infección causante de la enteropatía y no necesariamente por la ausencia real de bacterias, parásitos u otros agentes.

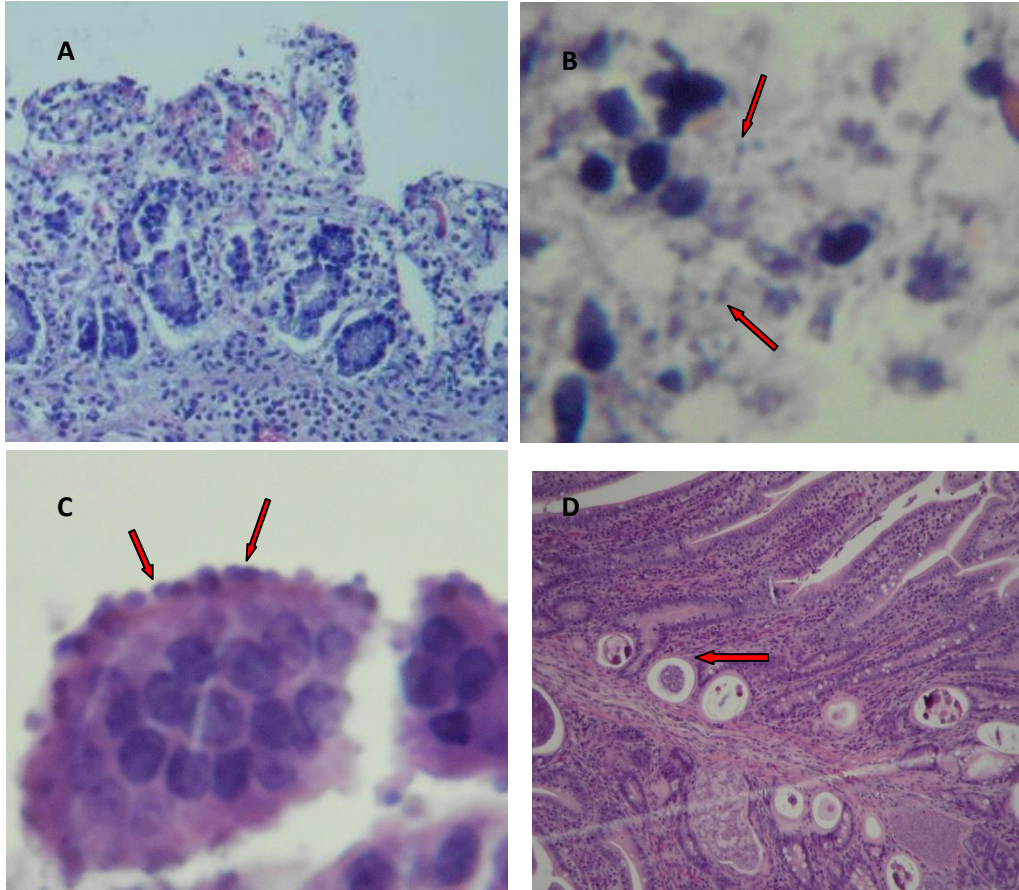


Figura 14. Cortes histológicos de yeyuno. A: Enteritis necrótica difusa aguda (HE 100x). B: Presencia de estructuras puntiformes compatible con bacterias (flechas) (HE 400x). C: Estructuras basófilas en el ápice de las vellosidades compatibles con *Cryptosporidium* sp. (flechas) (HE 400x). D: Formas intracelulares (esquizontes y gamontes) de *Eimeria* spp. (flecha) (HE 100x).

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha cuantificado los valores relativos de expresión de ARNm de las α defensinas denominada *Defa 8* por Patil *et al* (2003) y β defensinas denominada *β -def alp* por More *et al*, (2011) en la mucosa intestinal (yeyuno) en crías de alpacas con enteropatías. Para la cuantificación relativa usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) se utilizó como normalizador o control interno al gen de *GAPDH*, que es uno de los más usados por su poca variabilidad y su expresión constante en distintos tipos celulares (Walker *et al.*, 2009).

Los productos de *GAPDH* y las α y β defensinas (*Defa 8* y *β -def alp*, respectivamente) tienen temperaturas de disociación (T_m) similares y dentro del rango obtenidos de las crías de alpacas sanas (More *et al.*, 2011), demostrando que se detectan los mismos ARNm en ambos estudios. La región del gen *GAPDH* en estudio determinó dos tipos de ARNm en la población de alpacas, determinado por su temperatura de disociación del producto obtenido en el PCR tiempo real, siendo similar a lo reportado por More *et al*, (2011). Esta característica no afecta que pueda ser utilizado como gen calibrador (expresión constitutiva en el enterocito) en la PCR tiempo real, ya que se ha detectado en el 100% de crías sanas y enfermas en un nivel constante y menor que las defensinas en estudio.

Existe una mayor cantidad de ARNm de α y β defensinas (*Defa 8* y *β -def alp*, respectivamente) estadísticamente significativa en el grupo sanitario enfermos en

comparación a los sanos. Indicando una expresión inducible de los genes de las defensinas estudiadas en las alpacas. Similarmente en otros mamíferos se indica que la expresión de los genes de defensinas son inducibles por la estimulación de productos y componentes de los agentes microbianos como virus, hongos, parásitos y principalmente bacterias (Bevins, 2005).

Las α -defensinas se incrementan en un 18.15 veces más en las crías enfermas con enteropatías que el calibrador que es una cría recién nacida en comparación de 4.68 veces de un animal aparentemente sano. Este incremento de 13.47 veces la expresión de Defa 8 en los animales enfermos es significativo, y puede deberse a la estimulación de los componentes del agente microbiano causal de la enteritis. Se ha demostrado que ambas, α y β defensinas (*Defa 8* y *β -def alp*, respectivamente), son expresadas en una variedad de tejidos epiteliales, y sirven de protección como una de las primeras respuestas del sistema inmune innato. Las células de diferentes tejidos celulares poseen los genes de las diferentes defensinas y receptores celulares, sin embargo, no todos los tipos celulares expresan todas las defensinas y/o determinados tipos de receptores celulares como los TLRs y NOD específicos para cada tipo de microorganismo. Las células epiteliales son altas productoras de β defensinas (Durr y Peschel, 2002). Las muestras trabajadas contienen los diversos tipos celulares presentes en la mucosa intestinal de las crías de alpacas, incluyendo las células de Paneth que son las mayores productoras de α defensinas, debido a que se obtuvieron de un raspado profundo de la mucosa; por lo que las cantidades obtenidas de las defensinas representan el total de todas ellas. Pero además en los tejidos de los animales enfermos se encuentra un buen número de leucocitos, que migran desde los vasos sanguíneos a la mucosa intestinal constituyendo un componente celular de los tejidos inflamados, contribuyendo a la mayor expresión de alfa defensinas que se expresan en este tipo de células inflamatorias (Ganz T. 1999).

Las enteropatías que se observan en las crías de alpacas son mayormente enteritis necrótica difusa aguda (figura 13), las cuales pueden ser producidas por agentes infecciosos de mayor prevalencia en la zona, que incluyen a *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.* y coccidias (Martín *et al.* 2010;

Palacios, 2005). Últimamente se están determinando la presencia de los rotavirus y, coronavirus como patógenos virales asociados a diarreas en alpacas (Genova *et al.*, 2008). Esta diversidad de patógenos, son capaces de estimular la respuesta inmune innata en la mucosa intestinal induciendo la expresión de péptidos antimicrobianos (defensinas) como se ha determinado en otros animales domésticos (Montaño y Vargas, 2002). Se ha demostrado una estimulación por la presencia de lipoproteínas o ácidos teicoicos de Gran-positivos, LPS de las Gram-negativas, β -glucanos de las levaduras, ácidos nucleicos virales y otros patrones moleculares asociados a patógenos, a través de la interacción de sus receptores celulares, que inician una cascada de señalización que finaliza con la activación del factor nuclear NF- κ B y la consecuente transcripción de los genes que codifican las defensinas (Montaño y Vargas, 2002; Castañeda *et al.*, 2009; Tellez y Castaño, 2010) por lo que existe una asociación directa entre la presencia de patógenos y la inducción de las alfa y beta defensinas como se observan en los resultados de este trabajo.

Los procesos inflamatorios detectados por histopatología en las muestras indican la participación de las interleucinas y citoquinas pro inflamatorias como IL-1 β , TNF α , los cuales están demostrado que inducen la expresión de los péptidos antimicrobianos (Castañeda *et al.*, 2009). Los primeros estudios en humanos, mostraban que la expresión de alfa defensinas no se incrementaba por estímulos microbianos, recientes estudios de cuantificación de mARN de alfa defensinas HD-5 en procesos inflamatorios, como enterocolitis necrotizante, han mostrado un importante aumento en su expresión. Además se ha demostrado que los péptidos antimicrobianos producidos por las células epiteliales actúan como quimioatrayentes de los leucocitos en un proceso inflamatorio (Durr y Peschel, 2002).

En las alpacas aparentemente sanas se observan una curva de expresión de defensinas tanto alfa como beta (More *et al.*, 2011) criadas en condiciones ambientales no controladas, no pudiendo diferenciarse si estas son expresadas constitutivamente o en forma inducida por continuos enfrentamiento a microorganismos patógenos presentes en el sistema de crianza extensivo en la región Cuzco. Algunas β -defensinas han mostrado una expresión constitutiva y no ser inducibles por estímulos infecciosos.

Sin embargo, en otras β -defensinas, como la HBD-2, se ha observado una expresión basal mínima y que bajo una estimulación microbial, incrementan enormemente su expresión (Rivas-Santiago *et al.*, 2006). De la misma forma se ha establecido la expresión y sobreexpresión o mayor expresión de diferentes defensinas en estudiadas en especies como bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos y aves (Bagnica *et al.*, 2010). En la fase de infección o de la enfermedad, si bien, las defensinas son parte de una respuesta relativamente inmediata por parte del sistema inmune innato, no dejan de necesitar un tiempo para el reconocimiento y activación de factores transcripcionales, cuando se inicia una infección o desequilibrio del ambiente de la microflora intestinal, existen diferencias en la forma que el agente infeccioso realizará el daño celular o del tejido, dependiendo de los factores de virulencia y del grado de patogenicidad que posean, siendo, a través de la sobreestimulación de la función secretora (Salmonelosis, Colibacilosis), interfiriendo con la absorción (enteritis viral), incremento de la permeabilidad e hipermotilidad (enteritis clostridial), que se verá reflejado en diferentes tipos y grados de lesión celular (Palacios, 2005), el cual influenciaría en el reconocimiento de microorganismos y expresión de defensinas, además de la cuantificación relativa de ARNm.

Las crías de alpaca enfermas muestran diferentes niveles de expresión relativa por grupo etario, tanto para α - y β - defensinas (*Defa 8* y *β -def alp*, respectivamente). Sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, debido posiblemente a que, la expresión individual podría ser similar por los siguientes factores: 1.- Grado de estimulación o carga antigénica, 2.- IL naturaleza del patógeno o microorganismos implicados en la infección 3.- cantidades de Células de Paneth y enterocitos. Estos últimos fueron recientemente estudiados en la participación en la respuesta inmune innata contra patógenos por la interacción específica con patrones moleculares de microorganismos a través de receptores tipo TLRs, que desencadenará la comunicación celular y la activación de NF- κ B y la secreción de citoquinas inflamatorias, y péptidos antimicrobianos (defensinas). Se evidenció el correlativo incremento de ARNm con la estimulación bacteriana, en diferentes estudios (Kaiser y Diamond., 2000; Palazzo *et al.*, 2007);

Al contrastar la expresión de ambas defensinas α - y β - defensinas (*Defa 8* y *β -def alp*, respectivamente) del grupo de animales sanos con el de enfermos se evidenció, dos cinéticas de expresión diferentes hasta la sexta semana. En la alfa α -defensina (*Defa 8*), no se encontró diferencia estadísticamente significativa de expresión entre animales sanos y enfermos en todos los grupos etarios según la prueba de T de Student a excepción de los animales de la sexta semana, si bien, los valores de ARNm son relativamente mayores, las α -defensinas, son expresadas en bajos niveles durante la etapa fetal y del neonato, estos niveles de expresión se pueden incrementar en condiciones de enfermedad, sin embargo, las α -defensinas son expresadas por polimorfonucleares y células de Paneth (Bevins, 2005.).

A diferencia de la α -defensina (*Defa 8*), la β -defensina (*β -def alp*) cuyos niveles de expresión son tan elevados que existe diferencia significativa en todos los grupos etarios a excepción de la animales de la semana 4, se debería a que, las beta defensinas en intestino, no solo, son expresadas por células típicas productoras de defensinas, como son células de Paneth y linfocitos intraepiteliales, sino que su expresión también es realizada en las diferentes células epiteliales que forman parte de la mucosa (Montaño y Vargas, 2002; Patil *et al.*, 2004; Rivas-Santiago *et al.*, 2005). Además, los péptidos antimicrobianos se sintetizan hasta 100 veces más rápido que una inmunoglobulina y a mucho menor costo metabólico, almacenándose en altas concentraciones y estando disponible para ser liberadas en contacto con microorganismos (Montaño y Vargas, 2002); los grupos de la semana 4 no presentan diferencia significativa a la Prueba de T Student, debido a que no se cuenta con una cantidad de muestra necesaria para realizar un mejor análisis.

VI. CONCLUSIÓN

- La expresión relativa de α y β defensinas (*Defa 8* y *β -def alp*, respectivamente) en yeyuno, se incrementan y son significativamente mayores en crías de alpaca con enteropatías (enfermas) en comparación a las crías de alpaca sanas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera N, Pérez M, López M, Martín J. 2004. Mucosal immune system: A brief review. *Inmunología*. 23(2): 207-216.
2. Ameghino E, De Martini J. 1991. Mortalidad en crías de alpacas. *Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA)*. UNMSM. Lima. 71 p.
3. Ayabe T, Satchell D, Pesendorfer P, Tanabe H, Wilson C, Hagen S, Ouellette A. 2001. Activation of Paneth Cell α -Defensins in Mouse Small Intestine. *J. Biol. Chem.* 277(7)15: 5219–5228.
4. Bagnicka E, Strzałkowska N, Jóźwik A, Krzyżewski J, Horbańczuk J, Zwierzchowski L. 2010. Expression and polymorphism of defensins in farm animals. *Acta Biochimica Polonica*. 57 (4): 487–497.
5. Bailey M, Haverson K. 2006. The postnatal development of the mucosal immune system and mucosal tolerance in domestic animals. *Vet. Res.* 37: 443–453.
6. Bevins C. 2005. Events at the Host-Microbial Interface of the Gastrointestinal Tract V. Paneth cell α -defensins in intestinal host defense. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289: G173-G176.
7. Brogden K. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Microbiology*. 3: 238-250.

8. Castañeda J, Ortega J, Venegas A, Aquino A, Serafín J, Estrada S, Estrada I. 2009. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alerg Asma Inmunol Pediatr.* 18 (1): 16-29
9. Cesta M. 2005. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol. Pathol.* 34:599–608.
10. Colonna M, Pulendran B, Iwasaki A. 2006. Dendritic cell at the host-pathogen interface. *Nature Immunology.* 6 (2): 117-120
11. Cunliffe R., Mahida Y. 2004. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J. Leukoc. Biol.* 75: 49-58.
12. Day R. 2006. Epithelial Stem Cells and Tissue Engineered Intestine. *Current Stem Cell Research & Therapy.* 1: 113-120.
13. De Yang, Biragyn A, Kwak L, Oppenheim J. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *TRENDS in Immunology.* 23 (6): 291-296.
14. De Yang, Chertov O., Oppenheim J. 2001. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in antimicrobial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidins. *J. Leukoc. Biol.* 69: 691-697.
15. Durr M, Peschel A. 2002. Chemokine Meet Defensin: the Merging Concepts of Chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun* 4:615-617.
16. Fasano A, Shea-Donohue T. 2005. Mechanisms of Disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2: 416–422.
17. Fernández-Baca S. 1991. Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Santiago: FAO. 362 p.
18. Fernández-Baca S. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú.
19. Ganz T. 1999. Defensins and Host Defense. *Science.* 286 (5439), 420-421.
20. Ganz T. 2003. The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. *Integr. Comp. Biol.* 43:300-304.
21. Ganz T. 2004. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C. R. Biologies* 327: 539–549.

22. Garmendia A, Palmer G, DeMartini JC, McGuire T. 1987. Failure of passive immunoglobulin transfer. A major determinant of mortality in newborn alpacas Lama pacos. *American Journal of Veterinary Research* 49(10): 1472-1476.
23. Genova S, Streeter R, Simpson KM, Kapil S. 2008. Detection of an Antigenic Group 2 Coronavirus in an Adult Alpaca with Enteritis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15:1629-1632.
24. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S. 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *CEJB* 2 (1): 1–33.
25. Gripar S, Anand R, Sodhi C, Hackam D. 2008. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 83: 493–498.
26. Hamanaka Y, Nakashima M, Wada A, Ito M, Kurazono H, Hojo H, Nakahara Y, Kohno S, Hirayama T, Sekine I. 2001. Expression of human β - defensin 2 (hBD-2) in helicobacter pylori induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against helicobacter pylori. *Gut.* 49: 481-487.
27. Hathaway L, Kraehenbuhl J. 1999. The role of M cells in mucosal immunity. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 323–332.
28. Harrison O, Maloy K. 2011. Innate Immune Activation in Intestinal Homeostasis. *J Innate Immun.* 3: 585–593.
29. Haverson K, Riffault S. 2006. Antigen presenting cells in mucosal sites of veterinary species. *Vet. Res.* 37: 339–358.
30. Hollox EJ, Barber J, Brookes A, Armour J. 2008. Defensins and the dynamic genome: What we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1 *Genome Res.* 18: 1686-1697.
31. Hooper L, Stappenbeck T, Hong C, Gordon J. 2003. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat immunol.* 4 (3): 269-273.
32. Hornef M, Wick M, Rhen M, Normark S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology.* 3 (11): 1033-1040.
33. Iizuka M, Konno S. 2011. Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 17 (17): 2161-2171.

34. Jenssen H, Hamill P, Hancock R. 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (3): 491-511.
35. Kaiser V, Diamond G. 2000. Expression of mammalian defensin genes. *J. Leukoc. Biol.* 68: 779-784.
36. Kamysz W, Okrój M, Lukasiak J. 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Bioquímica Polonica.* 50: 461-469.
37. Kelsall B, Rescigno M. 2004. Mucosal dendritic cell in immunity and inflammation. *Nature Immunology.* 5 (11): 1091-1095
38. Keshav S. 2006. Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *J. Leukoc. Biol.* 80: 500–508.
39. Kim Y, Ho S. 2010. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12:319–330.
40. Lavery G, Gorman S, Gilmore B. 2011. The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 6566-6596.
41. Liebler E, Pabst R. 2006. MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res.* 37: 257–280.
42. Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Elsevier Science* 25: 402-408.
43. Martin C, Pinto C, Cid M. 2010. Camélidos sudamericanos: estado sanitario de sus crías. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4 (1): 37-50.
44. Marshall S, Arenas G. 2003. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology.* 6: 271-285.
45. Mesteckya J, Moldoveanu Z, Elson C. 2005. Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens. *Vaccine* 23: 1800–1803.
46. Mogensen T. 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22 (2): 240-273.
47. More J, Manchego A, Sandoval N, Ramirez M, Pezo D, Chiok K, Rivera H. 2011. Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos (α - y β -defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*vicugna pacos*). *Rev. investig. vet. Perú*, oct./dic. vol.22, no.4, p.324-335. ISSN 1609-9117.

48. Montaña K, Vargas F. 2002. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. INCI. 27 (1):21-27. ISSN 0378-1844.
49. Mowat A, Millington O, Chirido F. 2004. Anatomical and Cellular Basis of Immunity and Tolerance in the Intestine. JPGN. 39: S723–S724.
50. Oppenheim J, Biragyn A, Kwak L, Yang D. 2003. Roles of Antimicrobial Peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. Ann. Rheum. Dis. 62: 17-21.
51. Ouellette A. 1999. Mucosal Immunity and Inflammation. IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 277: 257-261.
52. Ouellette A, Satchell D, Hsieh M, Hagen S, Selsted M. 2000. Characterization of Luminal Paneth Cell α -Defensins in Mouse Small Intestine. The Journal of Biological Chemistry. 275(43): 33969-33973.
53. Palacios C, Perales R, Chavera A. 2005. Caracterización anátomo-histopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. Rev. Investig. Vet. Perú, 16 (1):34-40. ISSN 1609-9117.
54. Palazzo M, Balsari A, Rossini A, Selleri S, Calcaterra C, Gariboldi S, Zanobbio L, Arnaboldi F, Shirai Y, Serrao G, Rumio C. 2007. Activation of Enteroendocrine Cells via TLRs Induces Hormone, Chemokine, and Defensin Secretion. *J Immunol.* 178: 4296-4303.
55. Patil A, Hughes A, Zhang G. 2004. Rapid evolution and diversification of mammalian α -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. Physiol. Genomics. 20: 1-11.
56. Perez D. 2006. Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 91 p.
57. Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. Nucleic Acids Research. 29: 9.
58. Ramírez A, Franco E, Pezo D, García W. 1998. Diagnóstico y control de enfermedades en CSA. Pub. Tec. FMV 34: 9-14.
59. Rebrikov D, Trofimov D. 2006. Real-Time PCR: A review of Approaches to Data Analysis. Applied Biochemistry and Microbiology 42(5): 455-463.

60. Reddy K, Yedery R, Aranha C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24:536–547.
61. Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*. 48 (1): 62-71.
62. Rosadio RH, Ameghino EF. 1994. Coccidial infections in neonatal Peruvian alpacas. *Vet Rec* 135: 459-460.
63. Rosadio R. 2010. Mortalidad neonatal en alpacas. En: Cid, M. *Sanidad de alpacas en la etapa neonatal*. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 148 p
64. Rutella S, Locatelli F. 2011. Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 17(33): 3761-3775.
65. Sahl HG, Pag U, Bonness S, Wagner S, Antcheva N, Tossi A. 2005: Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J Leukoc Biol*. 77: 466-475.
66. Sanderson I, Walker WA, 2007. TLRs in the Gut I. The role of TLRs/Nods in intestinal development and homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 292(1): G6–10.
67. Sansonetti P. 2006. The innate signalling of dangers and the dangers of the innate signalling. *Nature immunology*. 7 (12): 1237-1242.
68. Shi J, Aono S, Lu W, Ouellette A, Hu X, Ji Y, Wang L, Lenz S, Van Ginkel F, Liles M, Dykstra C, Morrison E, Elson C. 2007. A Novel Role for Defensins in Intestinal Homeostasis: Regulation of IL-1 β secretion. *The journal of immunology*. 179: 1245-1253.
69. Snoecka V, Peters I, Cox E. 2006. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet. Res*. 37: 455–467
70. Tanabe H, Yuan J, Zaragoza M, Dandekar S, Henschen-Edman A, Selsted M, Ouellette A. 2004. Paneth Cell α -Defensins from Rhesus Macaque Small Intestine. *Infect. Immun*. 72 (3): 1470-1478.
71. Takahashi I, Nochi T, Kunisawa J, Yuki Y, Kiyono H. 2009. The mucosal immune system for secretory IgA responses and mucosal vaccine development. *Rev. Inflammation and regeneration*. 30 (1): 40-47.

72. Téllez G, Castaño J. 2010. Antimicrobial peptides. *Infectio*. 14 (1): 55-67.
73. Uehara N, Yagihashi A, Kondoh K, Tsuji N, Fujita T, Hamada H, Watanabe N. 2003. Human β -defensins-2 induction in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosal tissues: antimicrobial effect of overexpression. *Journal of Medical Microbiology*. 52: 41-45
74. Uhlig H, Powrie F. 2003. Dendritic cell and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J. Clin. Invest.* 112: 648-651
75. Walker C, Meier S, Mitchell M, Roche J, Littlejohn M. 2009. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. *BMC Molecular Biology*. 10 (100): 1186-1198.
76. Walker WA. 2002. Development of the Intestinal Mucosal Barrier. *JPGN* 34: 533–539.
77. Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Michael Schröder J, Stange E. 2004. NF- κ B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a Novel Effect of a Probiotic Bacterium. *Infect. Immun.* 72 (10): 5750-5758.
78. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale B. 1998. Epithelial Antimicrobial Peptides: Review and Significance for Oral Applications. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9 (4):399-414.
79. Wershil B, Furuta G. 2008. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 121: S380-3
80. Wiesner J, Vilcinskas A. 2010. Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 1:5, 440-464.
81. Yeaman M, Yount N. 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* 55: 27-55.
82. Yount N, Yeaman M. 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings the National Academy of Science of the United States of America PNAS*. 101: 7363-7368.
83. Yuan Q, Walker WA. 2004. Innate Immunity of the Gut: Mucosal Defense in Health and Disease. *JPGN* 38: 463-473.

84. Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
85. Zarza B, Kudsk K. 2001. The mucosa-Associated lymphoid tissue structure, function, and derangements. *Shock*. 15 (6): 411-420.

VIII. APÉNDICE

CUADRO A.1. Resultados de la cuantificación relativa de α - defensina (Defa 8) de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador (More *et al.*, 2011).

Nro.	Edad (Días)	Ct (Defa 8)	Ct (GAPDH)	2 ^{-ΔΔCt}
1	7	39.497	28.084	4.727
2	30	37.423	26.24	4.031
3	1	31.137	21.357	1.524
4	3	36.416	24.651	6.036
5	7	36.269	24.245	7.22
6	2	34.679	22.104	10.578
7	10	33.957	22.864	3.787
8	5	36.09	25.367	2.93
9	30	34.769	27.071	0.359
10	27	38.424	27.29	3.896
11	7	38.83	27.027	6.195
12	42	36.671	25.555	3.847
13	6	35.978	29.429	0.162
14	1	36.09	30.928	0.062
15	45	33.349	29.152	0.032
16	17	38.603	28.861	1.485
17	39	35.286	24.719	2.629
18	33	34.588	27.326	3.758
19	20	34.773	21.972	12.372
20	19	37.992	26.939	3.683
21	36	38.308	26.299	7.145
22	30	37.207	26.271	3.396
23	31	39.033	27.477	5.219
24	11	37.534	25.265	8.556
25	18	37.534	24.935	10.755
26	21	36.224	24.096	7.759
27	37	36.165	24.509	5.594
28	41	36.355	25.415	3.405
29	42	35.57	24.22	4.525
30	0(calibrador)	37.484	29.465	1

CUADRO A.2. Resultados de la cuantificación relativa de β - defensinas (β - *def alp*) de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador (More *et al.*, 2011).

Nro.	Edad (Días)	Ct (β - <i>def alp</i>)	Ct (GAPDH)	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	7	35.494	28.084	3.294
2	30	33.531	26.24	3.036
3	1	27.29	21.357	1.058
4	3	32.163	24.651	3.536
5	7	30.8605	24.245	1.899
6	2	22.674	22.104	0.028
7	10	30.307	22.864	3.371
8	5	32.906	25.367	3.595
9	30	36.002	27.071	13.501
10	27	35.226	27.29	4.746
11	7	36.002	27.027	9.747
12	42	32.717	25.555	2.768
13	6	36.313	29.429	2.283
14	1	36.662	30.928	1.03
15	45	34.863	29.152	1.014
16	17	25.128	28.861	0.001
17	39	34.077	24.719	12.685
18	33	34.039	27.326	2.031
19	20	32.331	21.972	25.44
20	19	31.442	26.939	0.439
21	36	33.522	26.299	2.893
22	30	31.985	26.271	1.017
23	31	27.986	27.477	0.027
24	11	33.31	25.265	5.116
25	18	30.688	24.935	1.045
26	21	31.505	24.096	3.292
27	37	32.666	24.509	5.529
28	41	31.506	25.415	1.321
29	42	31.747	24.22	3.573
30	0(calibrador)	36.757	29.465	1

CUADRO A.3. Resultados de RT-PCR tiempo real de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas enfermas utilizando los cebadores GAPDH.

Nro.	Edad (Días)	Ct (GAPDH)	Tm (°C)
1	7	28.77	83.4.
2	4	29.72	83.3
3	7	29.92	83.3
4	3	29.68	80.9
5	6	31.03	83.9
6	6	32.24	83.3
7	1	27.82	83.6
8	7	31.1	83.6
9	8	28.7	83.1
10	9	27.05	81.7
11	10	30.8	83.6
12	14	31.02	81.7
13	10	30.66	80.9
14	21	31.34	83.9
15	15	27.98	81.7
16	20	27.58	83.6
17	20	29.16	81.2
18	15	29	83.2
19	21	31.11	83.6
20	25	30.31	81.7
21	25	30.2	83.9
22	27	27.38	81.8
23	35	27.45	80.9
24	30	26.45	81.7
25	30	30.86	83.6
26	35	28.33	81.7
27	35	29.58	80.9
28	40	29.13	83.6
29	42	31.04	83.9

CUADRO A.4. Resultados de RT-PCR tiempo real de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas enfermas utilizando los cebadores Defa 8 (α -defensina).

Nro.	Edad (Días)	Ct (Defa 8)	Tm (°C)
1	7	35.6	84.5
2	4	34.29	83.7
3	7	34.72	84.5
4	3	35.61	82.7
5	6	34.54	82.9
6	6	34.53	84.6
7	1	34.14	85.6
8	7	35.46	82.7
9	8	32.46	80.3
10	9	31.94	82.7
11	10	33.61	85.6
12	14	35.71	82.2
13	10	33.18	84.1
14	21	35.03	84.3
15	15	33.76	80.7
16	20	34.4	84.3
17	20	36.33	85.2
18	15	33.62	80.9
19	21	35.32	81.8
20	25	33.16	83.9
21	25	34.09	84.2
22	27	30.28	82.3
23	35	33.31	80.9
24	30	35.51	83.7
25	30	34.06	85.6
26	35	34.08	82.7
27	35	33.2	80.9
28	40	33.51	84.5
29	42	32.84	83.1

CUADRO A.5. Resultados de RT-PCR tiempo real de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas utilizando los cebadores β -def alp (β -defensina).

Nro.	Edad (Días)	Ct (β -def alp)	Tm (°C)	Ct (GAPDH)
1	0 (calibrador)	36.76	81.9	29.47
2	7	30.42	77.3	28.77
3	4	33.88	76.2	29.72
4	7	29.38	80.2	29.92
5	3	29.33	77.4	29.68
6	6	29.67	77.6	31.03
7	6	30.99	80.8	32.24
8	1	28.66	75.7	27.82
9	7	29.9	70.3	31.1
10	8	29.82	77.4	28.7
11	9	26.43	77.4	27.05
12	10	28.99	75.3	30.8
13	14	29.38	78.3	31.02
14	10	28.86	71.9	30.66
15	21	29.32	76.2	31.34
16	15	29.34	77.4	27.98
17	20	28.2	77.1	27.58
18	20	29.42	79.7	29.16
19	15	27.3	72.6	29
20	21	28.83	73.4	31.11
21	25	29.05	79.6	30.31
22	25	31	77.4	30.2
23	27	28.89	72.8	27.38
24	35	26.33	77.1	27.45
25	30	28.79	71.4	26.45
26	30	30.09	75.3	30.86
27	35	29.01	77.4	28.33
28	35	29.15	75.3	29.58
29	40	29.54	75.7	29.13
30	42	31.7	75.3	31.04

CUADRO A.6. Resultados de la cuantificación relativa de α - defensina (*Defa 8*) de mucosa intestinal de crías de alpaca enfermas (enteropatías) con respecto al calibrador.

Nro.	Edad (Días)	Ct (<i>Defa 8</i>)	Ct (GAPDH)	2 ⁻ $\Delta\Delta$ Ct
1	0 (calibrador)	37.484	29.465	1.00
2	7	35.6	28.77	2.28
3	4	34.29	29.72	10.92
4	7	34.72	29.92	9.31
5	3	35.61	29.68	4.25
6	6	34.54	31.03	22.77
7	6	34.53	32.24	53.04
8	1	34.14	27.82	3.25
9	7	35.46	31.1	12.63
10	8	32.46	28.7	19.15
11	9	31.94	27.05	8.75
12	10	33.61	30.8	36.99
13	14	35.71	31.02	10.05
14	10	33.18	30.66	45.22
15	21	35.03	31.34	20.10
16	15	33.76	27.98	4.72
17	20	34.4	27.58	2.30
18	20	36.33	29.16	1.80
19	15	33.62	29	10.55
20	21	35.32	31.11	14.02
21	25	33.16	30.31	35.98
22	25	34.09	30.2	17.50
23	27	30.28	27.38	34.75
24	35	33.31	27.45	4.47
25	30	35.51	26.45	0.49
26	30	34.06	30.86	28.23
27	35	34.08	28.33	4.82
28	35	33.2	29.58	21.10
29	40	33.51	29.13	12.46
30	42	32.84	31.04	74.49

CUADRO A.7. Resultados de la cuantificación relativa de β - defensinas (β - *def alp*) de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas enfermas con respecto al calibrador.

Nro.	Edad (Días)	Ct (β - def alp)	Ct (GAPDH)	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	0(calibrador)	36.757	29.465	1.00
2	7	30.42	28.77	49.94
3	4	33.88	29.72	8.77
4	7	29.38	29.92	227.86
5	3	29.33	29.68	199.74
6	6	29.67	31.03	402.26
7	6	30.99	32.24	372.73
8	1	28.66	27.82	87.55
9	7	29.9	31.1	360.04
10	8	29.82	28.7	72.10
11	9	26.43	27.05	240.85
12	10	28.99	30.8	549.51
13	14	29.38	31.02	488.43
14	10	28.86	30.66	545.71
15	21	29.32	31.34	635.61
16	15	29.34	27.98	61.05
17	20	28.2	27.58	101.97
18	20	29.42	29.16	130.87
19	15	27.3	29	509.17
20	21	28.83	31.11	761.13
21	25	29.05	30.31	375.33
22	25	31	30.2	90.01
23	27	28.89	27.38	55.02
24	35	26.33	27.45	340.62
25	30	28.79	26.45	30.95
26	30	30.09	30.86	267.24
27	35	29.01	28.33	97.82
28	35	29.15	29.58	211.13
29	40	29.54	29.13	117.95
30	42	31.7	31.04	99.18

Anexo A.1.

RNA Lysis Buffer + BME : RNA Lysis Buffer (10 ml), β -Mercaptoetanol (BME)
al 100% (200 μ l).

Anexo A.2.

DNasa : Yellow Core Buffer (40 μ l), MnCl_2 0.09 M (5 μ l),
DNase I (5 μ l).